

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

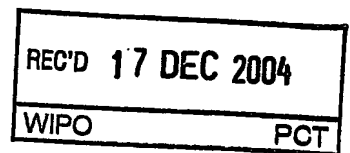


EPO - DG 1

06.12.2004



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung



Aktenzeichen:

103 49 411.1

Anmeldetag:

21. Oktober 2003

Anmelder/Inhaber:

Leica Microsystems Wetzlar GmbH,
35578 Wetzlar/DE

Bezeichnung:

Verfahren zur automatischen Erzeugung von
Laser-Schnittlinien in der Laser-Mikrodissektion

IPC:

G 01 N 33/48

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 25. Juni 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Remus

**Verfahren zur automatischen Erzeugung von Laser-Schnittlinien in der
Laser-Mikrodissektion**

- 5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren mit den Merkmalen des Oberbegriffs des Anspruchs 1. Die Unteransprüche geben vorteilhafte Ausgestaltungen an.

10 Laser-Mikrodissektions-Systeme dienen der Extraktion von ausgewählten mikroskopischen Objekten in biologischen Präparaten mittels eines von einem Laser erzeugten Laser-Strahls. Das in ausreichender Menge extrahierte Material (die gesammelten Dissektate) wird anschließend weiteren biochemischen Analyseschritten zugeführt. Die Laser-Mikrodissektions-Systeme werden derzeit überwiegend im medizinisch-biologischen Bereich eingesetzt.

- 15 Ein Verfahren zur Laser-Mikrodissektion und ein solches Laser-Mikrodissektions-System beschreiben beispielsweise die DE 100 43 506 C1 und die DE 100 18 251 C2. Ein solches Laser-Mikrodissektions-System setzt sich aus mehreren, präzise aufeinander abgestimmten Komponenten zusammen. Die zentrale Komponente ist ein in vielen Funktionen
20 motorisiertes Mikroskop mit einem elektronisch verstellbaren x-y-Tisch zur Aufnahme des zu bearbeitenden Präparats. Der in einer Lasereinheit erzeugte Laserstrahl wird über ein optisches System mit integrierter Strahlablenkung in den Strahlengang des Mikroskops eingekoppelt und wird zum Schneiden durch das Mikroskopobjektiv auf unterschiedliche Stellen des ortsfesten
25 Präparats gelenkt. In einer anderen Ausführungsform wird der Laserstrahl ortsfest gehalten und das Präparat mittels des x-y-Tisches relativ dazu

bewegt. Alle Steuerfunktionen werden von einem geeignet ausgelegten Programm, das auf einem angeschlossenen Computer läuft, ausgeführt. Über eine an das Mikroskop adaptierte Kamera wird der im Mikroskop sichtbare Bildausschnitts des Präparats auf den Computer-Bildschirm zur Darstellung
5 gebracht. Durch Ziehen der Computer-Maus kann der Benutzer ausgewählte Präparatbereiche mit einer Zeichenlinie umranden. Jede so gezeichnete Linie ist gekennzeichnet durch eine Folge von x-y-Punktkoordinaten, die relativ zu den Bildschirmkoordinaten definiert sind. Nach Auslösung des Schneidbefehls wird der Laserstrahl durch eine geeignete x-y-Abbildungs Vorrichtung so
10 gesteuert, dass die zuvor definierte Zeichenlinie auf das Präparat derart abgebildet wird, dass eine maßstabsgetreue, affine Abbildung der Bildschirmlinie auf dem Präparat abgefahren wird. Mit geeignet eingestelltem Laserstrahl wird somit ein Ausschneiden der vorher manuell markierten Objekte erreicht. Wie in der DE 100 18 251 C2 beschrieben, erlaubt das
15 System für die Weiterverarbeitung das selektive Sammeln der Dissektate in einem standardisierten kleinen Behälter unterhalb der Schnittebene, wobei mehrere Behälter zur Auswahl stehen und automatisch in die Auffangposition gefahren werden können.

20 Das bekannte Verfahren zur Laser-Mikrodissektion weist jedoch den Nachteil auf, dass die vom Benutzer vorgenommene Markierung der auszuschneidenden Objekte aufwendig, zeitintensiv und fehlerträchtig ist. Dies gilt insbesondere dann, wenn eine relativ umfangreiche Menge an Dissektaten für die nachfolgenden Analyseschritte erforderlich ist. Hier spielen
25 insbesondere Ermüdungserscheinungen und andere Einflüsse auf den Benutzer eine nicht unerhebliche Rolle.

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Laser-Mikrodissektion anzugeben, welches möglichst fehlerfrei einen hohen
30 Präparate-Durchsatz ermöglicht.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein gattungsgemäßes Verfahren zur Laser-Mikrodissektion mit den kennzeichnenden Merkmalen des Anspruchs 1.

Bei dem Verfahren wird zunächst ein elektronisches Bild (Grauwertbild oder Farbbild) zumindest eines Bildausschnittes des Präparats aufgenommen. Danach wird der Bildausschnitt bildanalytisch bearbeitet, wobei das auszuschneidende Objekt bildanalytisch ermittelt wird. Anschließend wird die

5 Soll-Schnittlinie um das auszuschneidende Objekt automatisch bestimmt. Anschließend kann, vom Benutzer ausgelöst, das Objekt entlang der Soll-Schnittlinie mittels eines Laserstrahls ausgeschnitten werden.

10 In einer vorteilhaften Ausgestaltung des Verfahrens werden in einem zusätzlichen Verfahrensschritt aus der automatisch bestimmten Soll-Schnittlinie Steuersignale für eine Relativbewegung zwischen Laserstrahl und Präparat abgeleitet werden. Daraufhin wird die Laserschnittlinie automatisch, ohne Eingriff des Benutzers, erzeugt.

15 Die Erfindung löst die angesprochenen Nachteile durch konsequente Anwendung von bildanalytischen Methoden und einem wesentlich erhöhten Automatisierungsgrad des Mikroskops. Die Automatisierung betrifft in erster Linie die Positionierung des zu untersuchenden Präparatebereichs über den elektronisch verstellbaren Tisch.

20 Für einen besonders hohen Automatisierungsgrad und eine deutliche Erhöhung des Probendurchsatzes wird in einer weiteren Ausgestaltung des Verfahrens im zugeordneten Applikationsprogramm eine sogenannte Mäanderfunktion definiert, die im Routinebetrieb für den korrekten Vorschub

25 des Tisches mit dem Präparat sorgt. Dabei wird das Präparat automatisch mäanderförmig, Bildfeld für Bildfeld verfahren, so dass schrittweise ein vom Benutzer gewählter Präparatebereich vollständig mit der Kamera erfasst wird. Im Einstellmodus des Systems lassen sich zum einen die Grenzen des interessierenden Präparatebereichs sowie die Vergrößerung des

30 Mikroskopobjektivs definieren, welches das Bildfeld in seiner Größe festlegt. Zum anderen lassen sich Art und Einstellungen eines Fokussier-Systems definieren, mit dessen Hilfe während der automatischen Vorschubbewegung des Tisches für die notwendige Schärfeeinstellung der zu bearbeitenden

Bilder gesorgt wird. In Verbindung mit der Mäanderfunktion erlaubt dieses Verfahren eine vollautomatische Bearbeitung des Präparates, ohne dass ein Eingriff durch den Benutzer erforderlich ist,

- 5 Nach jedem automatischen Erreichen einer neuen Präparateposition wird mit der Kamera ein Bild aufgenommen. Jedes aufgenommene Bild wird mit bildanalytischen Methoden daraufhin untersucht, ob Objekte enthalten sind, deren charakteristische Merkmale mit zuvor eingelernten Merkmalen übereinstimmen, wobei der Übereinstimmungsgrad einstellbar ist. Bei
- 10 ausreichender Übereinstimmung wird das Objekt erkannt und markiert. Für alle erkannten Objekte erfolgt über eine automatische Konturberechnung die Erzeugung einer individuellen und geschlossenen Begrenzungslinie. Diese Begrenzungslinie wird durch eine Matrixtransformation formerhaltend so ,aufgeweitet', dass sie das Objekt in einem größeren Abstand als Schnittlinie
- 15 umschließt. Diese Vorgehensweise erlaubt es, die endliche Schnittdicke des Laserstrahls zu berücksichtigen. Jede so gewonnene Schnittlinie ist gekennzeichnet durch eine Folge von x-y-Punktkoordinaten, die relativ zu den Bildschirmkoordinaten definiert sind. Durch eine geeignete x-y-Abbildungsvorschrift wird eine maßstabsgetreue, affine Abbildung der
- 20 Schnittlinie generiert, die zur entsprechenden Auslenkung des Laserstrahls benötigt wird.

- Nach Bearbeitung des vorliegenden Bildes in der beschriebenen Art, wird mit Hilfe der automatischen Vorschubbewegung des Tisches das Präparat auf
- 25 das nächste Bildfeld positioniert und analysiert. Ein wählbares Auffangbehältnis wird automatisch in die Auffangposition gefahren. Dieser Vorgang wiederholt sich solange, bis der definierte Präparatebereich abgearbeitet oder eine zuvor eingestellte Zahl von Objekten ausgeschnitten wurde. Nach dem Schneiden hinterlässt jedes ausgeschnittene Objekt ein
- 30 Loch im Präparat genau dann, wenn der Ausschneidevorgang vollständig erfolgreich war. Das Loch entspricht in etwa der Fläche des zuvor detektierten Objektes (innerhalb der Konturlinie) ohne die Laserschnittdicken-Erweiterung. Daher ist ein Flächenvergleich des per Bildanalyse detektierten Schnittlochs

mit der Fläche des zuvor detektierten Objektes ein probates Mittel für die binäre Beurteilung des Schnittes.

Der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, dass nach
5 einmal erfolgter Einstellung das System ohne weitere Überwachung durch
einen Benutzer arbeitet. Das angegebene Verfahren führt damit zu einem
deutlich gesteigerten Probendurchsatz bei gleichzeitiger Erhöhung der
Robustheit und Zuverlässigkeit. Da die einmal erprobten Merkmals-
Datensätze gespeichert werden können, führt dies zu absolut
10 reproduzierbaren Bedingungen bei der Verwendung gleichartiger Präparate.
Gerade bei statistischen Messungen ist diese Reproduzierbarkeit unbedingte
Voraussetzung für einen guten Vertrauensbereich der Ergebnisse.

Durch die Verwendung mehrerer Merkmals-Datensätze ist es zudem möglich,
15 unterschiedliche Objekttypen innerhalb eines Präparates in einem Arbeitsgang
zu erkennen und auszuschneiden. Da für das Auffangen der Dissektate
mehrere Behältnisse unterhalb der Schnittebene zur Auswahl stehen, lassen
sich unterschiedliche Objekttypen auch in verschiedenen Behältnissen
sammeln.

20 Das System kann die Merkmals-Datensätze natürlich auch über einen
Datenbankserver und/oder ein beliebiges Netzwerk (LAN = Local Area
Network, WLAN = Wireless Local Area Network (Funknetz), Bluetooth,
TCP/IP, Internet), aber auch über beliebige Medien in gedruckter oder
25 elektronischer Form verteilen oder einlesen. Damit wird die Synchronisation
mehrerer Laser-Mikrodissektions-Systeme in einem Netzwerkverbund
ermöglicht. Gerade bei statistisch vorgegebenen umfangreichen Prüfmengen,
die unter Zeitdruck erfolgen müssen, erlaubt das Clustern und synchronisieren
mehrerer Laser-Mikrodissektions-Systeme über ein Netzwerk mittels
30 gleichgeschalteter Merkmals-Datensätzen die Lösung dieser Aufgabe.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der schematischen Zeichnung ausführlicher beschrieben. Es zeigen:

- Fig. 1.1: Merkmalsraum zur Klassifizierung der Objekte
- Fig. 1.2: Flussdiagramm des Verfahrensablaufs
- 5 Fig. 1.3: Zusammenfassen von Objekten in sogenannten Clustern
- Fig. 1.4: Cluster mit innenliegendem Loch
- Fig. 1.5: Bildausschnitt mit Binärobjekt
- Fig. 1.6: vier mit unterschiedlichen Grauwerten gelabelte Objekte
- Fig. 1.7: Freeman-Code und Objekt mit Codierung der Randpixel
- 10 Fig. 2: Laser-Mikrodissektions-Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens

Um Objekte in einem Bild automatisch zu klassifizieren, kann man bildanalytische Verfahren einsetzen. Bildanalytisch gestützte Analysen
15 basieren gewöhnlich auf einer Merkmalsanalyse. Bei dieser Vorgehensweise nutzt man die Tatsache, dass jedes Objekt über eine gewisse Anzahl individueller Merkmale erkannt und klassifiziert werden kann. Merkmale können z.B. Größen wie Fläche, Umfang, Durchmesser, Masse, Textur, Farbe, Form etc. sein. Indem man einen geeigneten Satz von Merkmalen
20 auswählt, kann man ein Objekt klassifizieren und gegen andere Objekte abgrenzen.

Diesen geeigneten Satz von Merkmalen trägt man gewöhnlich in einem n – dimensionalen Merkmalsraum auf. In Fig. 1.1 wurden exemplarisch die
25 Merkmale Farbe, Fläche und Durchmesser gewählt. Objekte mit „wenig“ Farbe und einem kleinen Durchmesser und einer kleinen Fläche werden dann z.B. durch den Merkmals-Cluster „Objekt 3“ klassifiziert. Dagegen wird „Objekt 2“ dadurch unterschieden, dass es viel Farbe und einen geringen Durchmesser sowie eine kleine Fläche hat. „Objekt 1“ hingegen verfügt über
30 weniger Farbe und einen großen Durchmesser sowie eine große Fläche. Gemäß Fig. 1.1 können wir also drei Objekte unterscheiden.

	Farbe	Umfang (μm)	Fläche (μm^2)
Objekt 1	wenig	groß	groß
Objekt 2	viel	klein	klein
Objekt 3	wenig	klein	klein

Tab 1.1: (Beispiel) Objektklassifikation anhand von Objektmerkmalen

- Es kann vorkommen, dass sich die Merkmalsbereiche von zwei Objekten überschneiden und sich daher keine eindeutige Zuordnung der Merkmale zu dem einen oder dem anderen Objekt treffen lässt. In diesem Fall kann eine eindeutige Zuordnung durch Hinzunahme von weiteren, neuen Merkmalen erwirkt werden.
- 10 Objektmerkmale werden durch bildanalytische Berechnungen ermittelt. Der vollständige Ablauf einschließlich der Ermittlung der Objektmerkmale lässt sich in verschiedene Teilschritte zerlegen. Das Flussdiagramm einer vorteilhaften Ausgestaltung des Verfahrens ist in Fig. 1.2 gezeigt.
- 15 **Bildaufnahme:**
Zunächst wird das Bild mittels einer geeigneten Vorrichtung, z.B. einem Mikroskop mit adaptierter Kamera aufgenommen, wobei die Kamera eine analoge oder eine digitale Kamera sein kann. Je nach Art der zu klassifizierenden Objekte kann eine Farb- oder eine Grauwertkamera zum Einsatz kommen.
- 20

Shading-Korrektur:

- Dieses Bild kann dann zunächst automatisch shading-korrigiert werden, d.h. dieser Schritt ist optional. Dabei wird der Tatsache Rechnung getragen, dass die Bildqualität durch eine nichthomogene Ausleuchtung des Bildfeldes bereits durch die Beleuchtung verfälscht wird. Dieses Problem wird im vorliegenden Fall gelöst durch die automatische Verwendung eines Shadingbildes, welches zuvor automatisch oder manuell erfasst und abgespeichert wurde. Dabei fährt der Objektträgerstisch an eine sogenannte Leerposition, die sich dadurch
- 25

auszeichnet, dass das System an dieser Stelle ein unverfälschtes Bild der Beleuchtungsverteilung mit unbelegtem Objektträger aufnehmen kann. Dieses Bild ist unverfälscht, da sich zwischen Objektiv und Beleuchtungsquelle kein biologisches Material auf dem Objektträger befindet. Dieses Korrekturbild wird
5 dann später auf alle unter den gleichen optischen Bedingungen aufgenommenen Bilder angewendet zum Zwecke der automatischen Korrektur des Shading-Einflusses durch die Inhomogenität der Präparat-Ausleuchtung.

10 **Graubildverarbeitung:**

Dem Schema in **Fig. 1.2** entsprechend schließt sich nun der Schritt Grauwertbearbeitung an, wobei auch die besagte Shading-Korrektur bereits als Grauwertbearbeitung verstanden werden könnte. In diesem Schritt werden zunächst kleinere Artefakte im Bild durch Grauwertmorphologie beseitigt.

15

Schwellenwert:

Es sind verschiedene bildanalytische Verfahren zur Schwellenwert-Bestimmung bekannt. Um ein möglichst robustes Verfahren zu bekommen, kann der optimale Schwellenwert für den Übergang vom Grauwertbild zum
20 Binärbild, was üblicherweise als Segmentation bezeichnet wird, vorzugsweise durch eine sogenannte Entropiemaximierung ermittelt werden. Die Idee bei der Entropiemaximierung ist die Ermittlung eines Schwellwertes (Threshold) im Grauerthistogramm des Bildes derart, dass sich das durch die Anwendung dieses Schwellwertes ergebene Binärbild eine möglichst große
25 Entropie aufweist. Wie z.B. aus H. Rohling, "Einführung in die Informations- und Codierungstheorie", Teubner Verlag 1995, bekannt, ist der Entropiegehalt das mittlere Maß für den Informationsgehalt eines Bildes. Durch die Bestimmung des Schwellwertes mittels Entropiemaximierung bekommt man daher ein Binärbild mit maximal möglichem Informationsgehalt.

30

Dieses Verfahren eignet sich gut für die automatische Segmentation, also die automatische Extraktion von Bildobjekten aus einem Bild. Einzelheiten zur Segmentation werden in Grundlehrbüchern zur Bildverarbeitung beschrieben,

beispielsweise in dem Buch von Serra, J. , „Image Analysis and Mathematical Morphology“, Academic Press, 1988.

Bei dem vorgestellten Verfahren ist die Segmentation von Bildobjekten eine
5 Voraussetzung für die Berechnung der Laserschnittlinie, d.h. der Linie, entlang
derer der Laser bei dem Laser-Mikrodissektions-Verfahren geführt wird. Bei
schwierig zu segmentierenden Bildobjekten kann der Benutzer zudem auch
auf manuelle Weise einen Schwellenwert zur Binärbilderzeugung angeben,
indem er für jeden Farbkanal getrennt einen Schwellenwert festlegt.

10

Binärbildverarbeitung:

Nach Fig. 1.2 schließt sich nun ein weiterer Schritt der Binärbildverarbeitung
an. Hier werden kleinere Artefakte (Einzelpixel, kleine Pixelkluster etc.) aus
dem Bild entfernt. Diese Vorgehensweise soll erfindungsgemäß dazu führen,
15 dass kleine Objekte mit einem Durchmesser, der für das Laserschnitt-
Verfahren zu klein ist, vor dem Schneiden eliminiert werden. Dabei ist der
Wert, ab welchem ein Objekt für das Laserschnittverfahren als zu klein
erachtet wird, einstellbar. Hierbei kann die bildanalytisch bekannte
Morphologie genutzt werden. Die bildanalytische Morphologie wird ausführlich
20 behandelt in Serra, J. , „Image Analysis and Mathematical Morphology“,
Academic Press, 1988. Im beschriebenen Verfahren wird speziell die Erosion
als spezieller bildmorphologischer Filter eingesetzt. Durch Wahl der Größe
des morphologischen Operators (SE = strukturierendes Element, Begriff aus
der mathematischen Morphologie) oder aber äquivalent durch die Anzahl der
25 Zyklen, mit der ein SE bestimmter Größe auf das Binärbild angewendet wird,
kann der Benutzer einstellen, welche Teilchengrößen vor dem Laserschnitt
ausgeschlossen werden sollen. Zudem kann man unter Ausnutzung der
Möglichkeiten der bildanalytischen Morphologie auch ganz bestimmte
Formen, also nicht nur Objektgrößen, sondern auch Objekte mit bestimmten
30 Formen, aus dem Bild herausfiltern. So gelingt z.B. das Ignorieren von
lanzettartigen kleinen Objekten, während kleine runde Objekte ungefiltert dem
Schneideprozeß zugeführt werden.

Bestimmung Objektmerkmale:

Im nächsten Analyseschritt werden zunächst die Objektmerkmale jedes segmentierten Objekts ermittelt (sogenannte Merkmalsextraktion). Die Merkmale, die zur Objektklassifizierung herangezogen werden, werden aus dem Binärbild bestimmt und nachfolgend Klassifikationsmerkmale genannt. Zu den klassifizierbaren Merkmalen gehören alle Merkmale, die derzeit mittels Bildanalyse gemessen werden können oder die aus a priori Wissen abgeleitet werden können sowie jegliche Linearkombination der Parameter. Merkmale sind z.B. Fläche, konvexe Fläche, äquivalenter Durchmesser, Länge, Breite, Winkel, Orientierung, Rundheit, Längen-Breiten-Verhältnis, Ausbauchung, Farbwerte in RGB-Metrik oder jeder anderen Farbmatrik, Kurvenlänge, Kurvenbreite, horizontale und vertikale Projektion, Textur, Energie etc.. Als ein sehr wichtiges Merkmal stellt sich die Position des sogenannten FCP, des Feature Count Points (ein wohl definierter Startpunkt zur Beschreibung der Lage eines Objektes), dar. Unter dem FCP versteht man ein ausgezeichnetes Randpixel im Binärbild, z.B. jenes Pixel, welches das unterste, rechteste Pixel im Binärobjekt ist oder aber jenes, welches das oberste, am weitesten links liegende Pixel ist. Es dient gewissermaßen als Startpunkt für die Kontur um jedes Binärobjekt.

Nach der Vermessung der Objekte im Binärbild liegt eine Liste mit den Merkmalen aller Objekte vor.

	FCP X	FCP Y	Fläche (μm^2)	Länge (μm)	Rundheit weitere
Objekt 1	10	23	10	23	1.2	...
Objekt 2	26	123	100	433	1.4	...
Objekt 3	234	28	4711	345	2.5	...
Objekt 4	165	278	2364	9721	1.8	...
...						...
Objekt n	276	345	1254	3453	2.3	...

Tab 1.2: (Beispiel) Merkmale die zu allen Binärbildobjekten gemessen wurden

Objektklassifizierung :

Der nächste Schritt besteht in einem Vergleich der extrahierten Objektmerkmale mit den vorgegebenen Klassifikationsmerkmalen. Dazu werden die Kombinationen der gemessenen Objektmerkmale der mit dem

- 5 Laser auszuschneidenden Objekte mit den Werten der Klassifikationsmerkmale auf Übereinstimmung geprüft. Auf diese Weise werden die gewünschten, auszuschneidenden Objekte von den nicht gewünschten Objekten unterschieden. Da für die gewünschten Objekte des gleichen Typs eine Anzahl charakterisierender Merkmale festgelegt wurde und
- 10 da für Objekte eines anderen Typs andere Merkmale festgelegt wurden, können alle Objekte eindeutig einen solchen Typ zugeordnet werden oder als Ausschuss, also nicht brauchbar, klassifiziert werden. Die nicht brauchbaren Objekte werden dann ausgesondert und damit auch nicht ausgeschnitten.
- 15 Nachfolgen wird ein Beispiel hierzu gegeben:

	Ge- messene Fläche (μm^2)	Vergleichswert der Fläche (μm^2)	Beurteilung, ob das Objekt ausgeschnitten werden soll
Objekt 1	10	5 ... 500	10 innerhalb Intervall [5,500] = ausschneiden
Objekt 2	100	5 ... 500	100 innerhalb Intervall [5,500] = ausschneiden
Objekt 3	4711	5 ... 500	4711 außerhalb Intervall [5,500] = NICHT ausschneiden
Objekt 4	2364	5 ... 500	2364 außerhalb Intervall [5,500] = NICHT ausschneiden
...			...
Objekt n	1254	5 ... 500	1254 außerhalb Intervall [5,500] = NICHT ausschneiden

Tab 1.3: (Beispiel) Objektidentifikation über Merkmalsbereiche

- In **Tab 1.3** ist wird jede gemessene Objektfläche mit einem
- 20 Flächenwertebereich verglichen. Im Beispiel wird ein Objekt dann identifiziert, wenn seine gemessene Fläche innerhalb der vorgegebenen Vergleichswerte

oder Grenzwerte liegt. Ist der Vergleich Wahr, ist also die gemessene Fläche (z.B. $10 \mu\text{m}^2$) innerhalb des Wertebereichs [$5 \mu\text{m}^2$, $500 \mu\text{m}^2$], so wird das Objekt akzeptiert und letztlich durch den Laser ausgeschnitten. Formal lässt sich also sagen:

5

wenn $F_{\text{gemessen}} \in \text{Wertebereich} \Rightarrow \text{dann Teilchen ausschneiden}$,
wenn $F_{\text{gemessen}} \notin \text{Wertebereich} \Rightarrow \text{dann Teilchen nicht ausschneiden}$,

10 wobei F die Fläche des Objekts bedeutet. Natürlich kann der Benutzer auch andere Kriterien zum Ausschneiden definieren.

So können natürlich auch Objekte, die sich nicht im Wertebereich befinden, per Laser ausgeschnitten werden:

15

wenn $F_{\text{gemessen}} \notin \text{Wertebereich} \Rightarrow \text{dann Teilchen ausschneiden}$
wenn $F_{\text{gemessen}} \in \text{Wertebereich} \Rightarrow \text{dann Teilchen nicht ausschneiden}$

Führt man folgende Schreibweise ein

20

$FW = F \text{ ist im Wertebereich} ; \overline{FW} = F \text{ nicht ist im Wertebereich}$,

so wird deutlich, dass man jede Kombination von gemessenen Merkmalen, jeweils mit einem individuellen Wertebereich versehen, dazu verwenden kann, ein Kriterium festzulegen, welches es erlaubt, bestimmte Objekte in dem

25

Präparat für das Ausschneiden zu identifizieren.

FW	Fläche im Wertebereich
RW	Rundheit im Wertebereich
LW	Länge im Wertebereich
CW	Farbe (Color) im Wertebereich
...	... weitere Merkmale im Wertebereich ...

Tab 1.4: (Beispiel) Verschiedene Merkmale im Wertebereich, der zuvor definiert wurde

5

Somit könnte man die Ausschneidebedingung definieren als

Ausschneiden wenn $FW + RW + LW + CW$,

10 oder aber

Ausschneiden wenn $FW + \overline{RW} + \overline{LW} + CW$.

15

Letzteres bedeutet, dass ein Objekt vom Laser dann ausgeschnitten wird, wenn die Fläche des gemessenen Objekts innerhalb des Wertebereichs liegt, die Rundheit und die Länge jeweils außerhalb der entsprechenden Wertebereiche liegen und zugleich die Farbe des Objekts innerhalb des Wertebereiches liegt.

20

Da auf diese Weise sehr viele individuelle, gemessene Merkmale mit ihren zugehörigen Wertebereichen verglichen werden können und viele Merkmale kombiniert werden können, ist nahezu jedes Objekt im Bild eindeutig durch einen bestimmten Satz von Merkmalen identifizierbar.

25

Es können zudem verschiedene Objekttypen erkannt werden und in verschiedenen Auffangbehältern individuell gesammelt werden. Z.B. können

zwei Objekttypen individuell unterschieden werden mittels

Objekt 1: Ausschneiden wenn $FW1 + RW1$ und

5 *Objekt 2: Ausschneiden wenn $FW2 + RW2$*

falls $W1$ nicht gleich $W2$. Da das System verschiedene Auffangbehälter für das Schnittgut besitzt, können verschiedene Objekte auch individuell gesammelt werden.

10

Wenn die für das Ausschneiden vorgesehenen Objekte identifiziert wurden, werden diese selektiv weiteren Prozess-Schritten unterworfen.

15

Beispielsweise werden eng beieinanderliegende Gruppen von Objekten im Bild geclustert, d.h. zu einer gemeinsam auszuschneidenden Objektgruppe zusammengefasst. Dadurch wird erfindungsgemäß verhindert, dass der Laser während des Schneidens benachbarte Präparatobjekte „durchschneidet“, da diese Objekte zu dicht an dem Objekt liegen, welches zurzeit gerade ausgeschnitten wird (Fig. 1.3). Auch hier kann man die Morphologie einsetzen: Im vorliegenden Ausführungsbeispiel wird eine Clusterung durch Schließen erreicht, wobei unter n-maligem Schließen in der Bildanalyse die sequentielle Ausführung von n Dilatationen, gefolgt von n Erosionen, gemeint ist. Dieses Prinzip ist bekannt von Schnaider, siehe

20

http://www.zgdv.de/zgdv/departments/z2/Z2Staff/schnaide/local_images/ME2003-02.pdf.

25

30

Des weiteren können innere „Löcher“ in Clustern von für das Schneiden vorgesehene Objekte beim Schnitt extra behandelt werden. Löcher ergeben sich dadurch, dass Objekte zwar clustern, jedoch im Inneren des Clusters ein gewisser Bereich frei ist, also ohne Objekte, die es auszuschneiden gilt (Fig. 1.4). Indem eine innere und eine äußere Schnittlinie bestimmt wird und indem die Reihenfolge der Schnitte so ist, das zuerst das Loch ausgeschnitten wird und dann der eigentliche Block ausgeschnitten wird. Erfindungsgemäß wird

damit erreicht, dass der „Reinheitsgrad“ ausgeschnittener Bereiche nicht durch die innerhalb liegender Löcher verringert wird.

- 5 Durch Vergleich der Objektposition mit der Bildrandposition kann zudem festgestellt werden, ob ein klassifiziertes Objekt den Rand des Videobildes touchiert oder nicht. Auf diese Weise wird erfindungsgemäß verhindert, dass der Laser unvollständige Objekte, die durch den Bildrand „abgeschnitten“ werden, ebenso unvollständig ausschneidet:

- 10 *Wenn Objekt Bildrand berührt dann Objekt nicht ausschneiden!*

Diese Option ist vorzugsweise durch den Benutzer wahlweise aktivierbar und abschaltbar.

- 15 Darüber hinaus ist es mit dem erfindungsgemäßen Verfahren möglich, die segmentierten Objekte verschiedenen Objekttypen zuzuordnen. Dazu werden für die unterschiedlichen Typen von Objekten im Präparat unterschiedliche Gruppen von Klassifikationsmerkmalen vordefiniert. Bei Übereinstimmung der Objektmerkmale eines Objekts mit einer bestimmten Gruppe von
- 20 Klassifikationsmerkmalen wird das Objekt klassifiziert und auf diese Weise dem durch die Klassifikationsmerkmale definierten Objekttyp zugeordnet. In einer besonderen Ausgestaltung weist das System einen visuellen Lernmodus auf, in dem ein Benutzer ohne umfangreiche Kenntnisse von bildanalytischen Methoden neue oder andere Kriterien zum Ausschneiden definieren kann.
- 25 Dazu wählt der Benutzer lediglich mit der Computermouse am Bildschirm die von ihm gewünschten Objekte bzw. Objekttypen aus und das System bestimmt zu den ausgewählten Objekten bzw. Objekttypen automatisch die Klassifikationsmerkmale.

- 30 **Schnittlinienbestimmung:**

In einer möglichen Ausführungsform des Verfahrens wird der Laser mittels einer Ablenkeinheit für die Richtungen x, y über das Präparat geführt und kann auf diese Weise Bereiche aus dem Präparat ausschneiden. In einer

anderen Ausführungsform wird der Laserstrahl ortsfest gehalten und der x-y-Tisch verfahren. Eine Kombination von Tischbewegung und Laserstrahlführung ist auch möglich. Um eine bestimmte Schnittfigur zu bekommen, muss der Laser relativ zu dem Präparat längst einer Kurve geführt werden. Die Kurve muss durch eine Schar von x, y Koordinaten gekennzeichnet sein.

Da ein Ausschnitt des Präparates per Kamera auf dem Monitor zu sehen ist und da eine Abbildungsvorschrift existiert, welche die Pixelkoordinaten des Bildes auf entsprechende Koordinaten der Laserbewegung abbildet, können in das Monitorbild eingezeichnete Kurven in einen Laserschnitt umgesetzt werden. Dazu werden die Koordinaten der Kurve im Monitorbild durch eine affine Abbildung auf die Laserbewegung übertragen.

Das heißt es gibt eine lineare Abbildung

$$f_u: V \rightarrow V$$

für einen Vektor

$$u \in V$$

mit

$$u: V \rightarrow V$$

Somit wird sich jeder Punkt auf dem Bild mittels der linearen Abbildung auf einen Punkt auf dem Präparat abgebildet, der durch den Laser bzw. durch die Laserablenkeinheit erreicht werden kann. Es gilt

$$\begin{pmatrix} x' \\ y' \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} x_T \\ y_T \end{pmatrix}$$

Wobei (x', y') die Laserposition und (x, y) die Bildkoordinatenposition und (x_T, y_T) ein linearer Verschiebungsvektor ist.

Diese Tatsache wird nun erfindungsgemäß dazu verwendet, um ein automatisches Ausschneiden der zuvor identifizierten und klassifizierten Präparatobjekte zu erreichen.

- 5 Dazu wird im ersten Schritt die Objektkontur um jedes einzelne identifizierte und klassifizierte Präparatobjekt ermittelt. Um die Objektkontur zu berechnen, kann man sich des sog. Freeman-Codes oder Kettencodes bedienen.

- 10 Zur Erläuterung der Vorgehensweise zur Ermittlung einer Konturlinie ist in **Fig. 1.5** exemplarisch ein einziges Binärobjekt eingezeichnet. Die Pixel des Bildausschnittes in **Fig. 1.5** sind gemäß ihrer x, y Koordinaten gekennzeichnet. Die Größe des Testbildes in **Fig. 1.5** ist 11 x 8 Pixel. Das Binärobjekt ist das durch grau eingefärbte Quadrate, welche die Bildpixel darstellen, gekennzeichnet. Die Außenkontur (graue Quadrate (Pixel))
15 kennzeichnet den äußeren Objektrand. Diesen Rand gilt es zu bestimmen, denn er ist Grundlage für die spätere Bestimmung der Laserschnittlinie. Würde der Laser, entsprechend abgebildet, entlang der Koordinatenfolge $\{(7,1), \{8,1\}, \{9,2\}, \dots \{6,3\}, \{7,2\}\}$ geführt werden, so wird das Objekt ausgeschnitten.

- 20 Als Startpunkt für das Ausschneiden wurde der oberste, linke Binärobjektpunkt gewählt, Punkt $\{7,1\}$. Dieser Aufpunkt wird im Folgenden allgemein Feature Count Point (FCP) genannt. Ein FCP ist immer der Startpunkt und hat wie jedes Pixel eine x-y-Koordinate. Im Folgenden wird für
25 jedes Binärbildobjekt der zu jedem Objekt zugehörige oberste, linke Konturpixel als Feature Count Point FCP definiert. Es kann natürlich jedes Konturpixel als FCP definiert werden, wichtig ist hier nur eine einheitliche Festlegung.

- 30 Um die Laserschnittlinie aus einem Bild automatisch zu bestimmen muss zunächst ein Binärbild vorliegen, in welchem die Bildobjekte von Interesse als binäres Muster vorliegen. Wenn ein solches Binärbild vorliegt, so haben alle Bildobjekte den gleichen Grauwert.

Um die Konturlinie für den Laserschnitt zu bestimmen, werden die Binärobjekte in dem Binärbild zunächst gelabelt, d.h. jedes Objekt bekommt einen individuellen, konstanten Grauwert zugewiesen, der allen seinen Pixeln zugeordnet wird, z.B. Grauwert 3 für alle Pixel eines Objekts usw.. Gewissermaßen wird hier aus dem Binärbild wieder ein Grauwertbild erzeugt, in dem alle Pixel, die zu einem zusammenhängenden Objekt gehören, einen einheitlichen, eindeutigen Grauwert bekommen. In Fig. 1.6 sind vier Objekte dargestellt, die jeweils durch eine zusammenhängende Pixelmenge dargestellt werden. Durch das Label bekam jedes Objekt, welches zuvor in dem Binärbild einen einheitlichen Grauwert hatte, nun einen individuellen Grauwert.

In Fig. 1.6 bekam z.B. das Objekt 2 den Grauwert 2. Dieses Objekt wurde also mit dem Grauwert 2 gelabelt.

Im nächsten Schritt werden für alle Objekte die Außenpixel, also jene Pixel, welche am Außenrand des Objektes liegen, bestimmt. Dazu werden zunächst alle Löcher in einem Objekt geschlossen. Dabei werden als Loch diejenigen Pixel bezeichnet, die vollständig von Pixeln mit anderen Grauwerten umschlossen sind. Ein solches Beispiel ist in Fig. 1.6 mit dem Objekt 4 gezeigt. Dieses Objekt weist ein solches innenliegendes Loch auf, das in diesem Beispiel aus zwei zusammenhängenden Pixeln besteht. Ob ein Objekt Löcher hat, lässt sich über die Eulerzahl feststellen:

$$E = K - L$$

mit

E = Eulerzahl

K = Anzahl der Objekte

L = Anzahl der Löcher

Die Eulerzahl ist ein topologisches Merkmal und ändert sich deshalb bei einfachen Transformationen nicht. Werden zunächst vor der Transformation

alle Löcher innerhalb der einzelnen Objekte des Bildes geschlossen, d.h. $L = 0$ und $E = K$, treten auch bei der Abbildung des Bildes auf die Laserschnittlinie keine Lochkonturen mehr auf.

- 5 Danach kann die Außenkontur jedes Bildobjektes, welches keine Löcher mehr hat, leicht bestimmt werden. Hierzu ist festzustellen, dass jedes Pixel, welches ganz innerhalb eines Objektes liegt, vollständig von Objektpixeln des gleichen Grauwertes umgeben ist. Jedes Pixel, welches nicht vollständig von Objektpixeln gehört, muss daher zum Außenrand des Objektes gehören,
- 10 wenn das Objekt keine Löcher hat. Dieses Kriterium wird für jedes Pixel überprüft und auf diese Weise die Randpixel bestimmt.

- Die Randpixel zu einem Objekt werden gemäß der Freeman-Vorschrift kodiert und in die dem Objekt zugeordnete Werteliste abgespeichert. Dabei wird zur
- 15 Richtungskodierung eine 8er-Umgebung verwendet, d.h. jedes Pixel ist von 8 anderen Pixeln umgeben. Prinzipiell kann man auch eine 4er-Umgebung verwenden, bei der entweder die 4 diagonalen oder die 4 nicht diagonalen Pixel berücksichtigt werden. Eine 8er-Umgebung ergibt eine höhere Genauigkeit, während eine 4er Umgebung schneller berechnet werden kann.

- 20 In Fig. 1.7a) ist eine solche 8er-Umgebung für einen Freeman-Code gezeigt. Der Zentralpixel ist jeweils von 8 Nachbarpixeln umgeben. Die Freeman-Notation gibt nun jedem Nachbarpixel, das eine bestimmte Schrittrichtung repräsentiert, eine eindeutige Zahl. Danach durchläuft man die Objektkontur von einem FCP aus anfangend.
- 25 In Fig. 1.7.b) sind die Randpixel eines Objektes dargestellt. In diesem Beispiel ist der FCP der äußerst linke, oberste Pixel. Dieser Punkt ist der Startpunkt. Von diesem Punkt aus bestimmt man die nächste Pixelposition z.B. im Uhrzeigersinn. Entsprechend dem Freeman-Code, wie in Fig. 1.7a)

- 30 dargestellt, findet man den nächsten Pixel auf Position 3. Von diesem Pixel aus betrachtet den nächsten Pixel an Position 3, von diesem aus betrachtet den nächsten Pixel auf Position 5 usw. .

- Indem jede Objektkontur vollständig, von dem jeweiligen FCP ausgehend, abgeschriftet wird, bekommt man einen Freeman-Code in Form einer Zahlenkette, welche die Kontur des jeweiligen Objekts vollständig beschreibt. Indem zusätzlich für jedes Objekt die Koordinaten des FCP gespeichert werden, sind alle Objekte im Bild vollständig in Kontur und Position beschreibbar. **Fig. 1.7c)** zeigt die entsprechende Schreibweise des Freeman-Codes für die Randpixel des in **Fig. 1.7b)** dargestellten Objektes. Durch dieses Kodierungsverfahren wird als Zwischenergebnis eine Liste mit Konturdaten zu allen Objekten erzeugt, welche die jeweilige Position des FCP umfasst, von dem aus eine Objektkontur beschrieben werden muss.

	FCP X	FCP Y	Freeman Code beschreibt Außenlaserschnittlinie von Objekt
Objekt 1	X_1	y_1	2 3 3 3 5 6 3 3 4 5 6 7 3 0 0 0 ...
Objekt 2	X_2	y_2	4 2 2 3 3 4 6 7 7 7 6 0 0 2 3 4 5 ...
Objekt 3	X_3	y_3	6 6 7 3 3 3 2 2 2 1 1 7 6 6 0 0 3 3 3 ...
Objekt 4	X_4	y_4	3 3 6 5 2 2 1 0 0 6 5 5 ...
...			
Objekt n	x_n	y_n	2 2 3 5 6 6 6 7 6 5 5 3 2 1 1 0 0 0 ...

Tab 1.5: (Beispiel) Bestimmung des Laserschnittcodes durch Verwendung eines Konturanalyseverfahrens

- 15 Aus dem Freeman-Code und den FCP-Koordinaten wird die exakte x-y-Position eines jeden Pixels berechnet. Damit ist die Laserschnittlinie zunächst vollständig beschrieben. Grundsätzlich sind jedoch auch andere Kodierungsverfahren möglich.
- 20 Wird eine Freeman-Codierung wie in **Fig. 1.7.** verwendet, so ergibt sich folgende Umrechnungstabelle für die jeweils nächste

Pixelposition in x, y:

Freemancode	Letzte Pixelposition	dx	dy
0	$x_{\text{Last}}, y_{\text{Last}}$	-1	-1
1	$x_{\text{Last}}, y_{\text{Last}}$	0	-1
2	$x_{\text{Last}}, y_{\text{Last}}$	+1	-1
3	$x_{\text{Last}}, y_{\text{Last}}$	+1	0
4	$x_{\text{Last}}, y_{\text{Last}}$	+1	+1
5	$x_{\text{Last}}, y_{\text{Last}}$	0	+1
6	$x_{\text{Last}}, y_{\text{Last}}$	-1	+1
7	$x_{\text{Last}}, y_{\text{Last}}$	-1	0

Tab 1.6: (Beispiel) Umrechnung des Freeman-Codes in konkrete
Pixelkoordinaten

5

Dabei werden zu Beginn die Startwerte des FCP eingesetzt:

$$x_{\text{Last}} = x_{\text{FCP}}$$

$$y_{\text{Last}} = y_{\text{FCP}}$$

10

Anschließend wird dem Freeman-Code an der Kontur entlang gefolgt. Am Ende dieser Prozedur liegt der Laserschnittcode für jedes identifizierte und klassifizierte Bildobjekt einzeln vor, welcher mittels der Transformation

15

$$\begin{pmatrix} x' \\ y' \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} x_T \\ y_T \end{pmatrix}$$

von den Bildkoordinaten auf die entsprechenden Laserkoordinaten übertragen wird. Der Translationsvektor $\{x_T, y_T\}$ kann die Laserschnittlinie verschieben.

20

Durch die Art der Abbildung wird außerdem die gefundene Laserschnittlinie, die das Objekt umgibt, skaliert. Dies wird genutzt, um Objekte mit geringerer

Auflösung (niedriger vergrößerndes Objektiv) bildanalytisch auszuwerten und dann, nach einer manuellen oder automatischen Umschaltung des Mikroskops auf eine höhere Auflösung (= höher vergrößerndes Objektiv), die klassifizierten Objekte per Laserstrahl auszuschneiden. Da die

- 5 Laserschnittlinie als Vektorbeschreibung vorliegt, gelingt eine nahezu verlustlose Skalierung der Laserschnittlinien, die bei niedriger Vergrößerung gefunden wurden, auf das Bild mit höherer Auflösung.

- 10 Da mit einer Umschaltung auf eine höhere Vergrößerung eine Verkleinerung des Bildfeldes einhergeht, liegen manche der Schnittlinien außerhalb des aktuellen Bildfeldes und sind daher zunächst nicht mehr mit dem Laserstrahl erreichbar. Da jedoch die Laserschnittlinienpositionen außerhalb des aktuellen Sehfeldes bekannt sind, können sie durch eine automatische Verstellung der Mikroskoptischposition repositioniert werden. Dies wird erreicht durch den
- 15 Einsatz geeigneter Mittel, wie beispielsweise eines automatischen Tisches, eines automatischen Objektivwechsels etc.

- 20 Bei sehr hohen Vergrößerungen und kleinen Objekten wird bei Bedarf die Tischpositionierungsgenauigkeit durch den zusätzlichen Einsatz von Piezo-Translatoren für die x- und y-Richtung des Tisches verbessert. Dabei kann gleichwirkend auch die Verstellung der Präparat-Halterung mittels Piezo-Translatoren erfolgen. Da der Laserstrahl über eine Ablenkeinheit in der Auflichtachse abgelenkt wird und dabei schneidet und außerdem zuvor die auszuschneidenden Objekte automatisch in Ihrer Position ermittelt wurden,
- 25 gelingt durch Kombination von Tischbewegung zum Anfahren der optimalen Schneidposition (in der Nähe der optischen Achse) und Laserschnitt entlang der automatisch gefundenen Laserschnittlinie per Ablenkeinheit ein hochpräzises und schnelles Ausschneiden der automatisch gefundenen Objekte.

30

Durch eine günstige Kombination von gleichzeitiger Bewegung des Laserstrahls mittels der Ablenkeinheit in der Auflichtachse, der „normalen“ Mikroskoptischbewegung und der gegebenenfalls vorhandenen feineren

Auflösung durch den zusätzlichen Einsatz von Piezo-Translatoren können die automatisch gefundenen Laserschnittlinien zudem schneller angefahren werden. Dabei wird der eigentliche Schneidprozess durch die Ablenkeinheit in der Auflichtachse vorgenommen, während die Grob- und Feinpositionierung
5 der Objekte durch geeignete automatische Bewegungen der beteiligten Aktoren (= Piezo-Translatoren) für die x-y-Positionierung vorgenommen werden.

10 Dabei wird das Problem der notwendigen Refokussierung nach Umschalten in einen anderen Auflösungsmodus, d.h. auf ein anderes Objektiv, durch den Einsatz eines Autofokus gelöst. Die erforderliche Geschwindigkeit wird durch den Einsatz eines Piezofokus am Objektiv erzielt, d.h. das Objektiv wird per Piezo-Translator vertikal bewegt.

15 Weitere Ausführungsmöglichkeiten einer Fokussierung bestehen in dem manuellen Scharfstellen oder aber durch Verwendung von Schrittmotoren zur elektronisch gesteuerten Fokussierung über die vertikale Z-Achse des Mikroskops. Der Vorteil der schnellen automatischen Fokussierung liegt erfindungsgemäß darin, dass ein optimaler Laserschnitt durchgeführt werden
20 kann, wenn der Laser stets in der gewünschten Schnittebene, d.h. Präparat-Ebene, fokussiert wird.

Bei vollautomatischen Prozessen wie der automatischen Laserschnittlinien-Bestimmung mit dem anschließenden Ausschneiden einer großen Anzahl von
25 Objekten ist eine automatische und schnelle Fokussierung unerlässlich.

Berücksichtigung der Schnittbreite des Lasers:

Da der Schnitt eines Laserstrahls eine gewisse, nicht zu vernachlässigende Breite hat, führt ein Schneiden direkt an der Außenkante eines Objektes dazu,
30 dass Teile des Objektrandes mit verbrennen. Dies führt zu unerwünschten Artefakten in der nachfolgenden Analyse. Diese biologischen Artefakte entstehen dadurch, dass die Verbrennung der Randstruktur zu einer Veränderung der molekularen Struktur in den Randbereichen der Objekte

führt. Da in den meisten Fällen aber die Objekte ausgeschnitten und gesammelt werden, um deren Eigenschaften in sich anschließenden biochemischen Analyse-Schritten (beispielsweise mittels PCR) zu bestimmen, sind Verbrennungen in den Randbereichen eines Objektes zu vermeiden.

- 5 Dies wird dadurch erreicht, dass der ausschneidende Laserstrahl in einem gewissen, einstellbaren Abstand so um das Objekt herum geführt wird, dass keine Verbrennungsartefakte auftreten können.

Ausführungsbeispiel 1:

- 10 Ein Ausführungsbeispiel ist die Anwendung mathematischer Morphologie auf das Binärbild, welches als Zwischenverarbeitungsschritt auf dem Wege der Bestimmung der Laserschnittlinie entsteht. Da das Binärbild vor der Bestimmung des Laserschnittlinienprofils entsteht, also vor der Berechnung der Schnittlinie mittels Freeman-Code und Umsetzung auf x-y-Koordinaten
15 (wie weiter oben beschrieben), wirkt sich eine Manipulation des Binärbildes auf die Konturbestimmung aus.

- Indem man das Binärbild dilatiert (Dilatation = morphologischer Bildverarbeitungsschritt) werden die Binärobjekte vergrößert. Um eine
20 möglichst symmetrische Vergrößerung zu erreichen, wird als strukturierendes Element SE ein symmetrisches Element genommen, welches maßstabsgetreu und richtungsunabhängig dilatiert. Das kann beispielsweise ein sogenanntes Diskelement (siehe z.B. Serra) sein. Um das Objekt zu verzerren, kann auch ein anderes SE genommen werden, welches die benötigten morphologischen
25 Anforderungen erfüllt. Darüber hinaus kann die Dilatation zyklisch mehrmals auf die Bildobjekte angewendet werden, wobei sich sich jedesmal jedes Bildobjekt im Binärbild um einen bestimmten Pixelbetrag vergrößert.

- Durch Wahl eines geeigneten SE wird erreicht, dass sich bei jedem
30 Anwendungszyklus das Objekt nur um etwa ein Pixel in jede Richtung ausdehnt. Das bedeutet, der Objektdurchmesser vergrößert sich um ca. 2 Pixel bei jeder Anwendung (Zyklus) eines einigen Dilatationsschrittes mit dieser SE.

Ferner kann man durch Kalibrierung der Bildpixel die Größe eines Pixels in μm ermitteln. Bei den gewöhnlich verwendeten quadratischen Pixeln ist daher

5
$$dx_{\text{Pixel}} = dy_{\text{Pixel}} = \text{Größe eines Pixels nach der Kalibrierung.}$$

Da der Laserstrahl eine bekannte Schnittbreite besitzt, kann nun die benötigte Objektvergrößerung, d.h. die Anzahl der Dilatationsschritte, die benötigt werden, um den Laserstrahl in einem sicheren Abstand um das Objekt zu führen, bestimmt werden.

Beispiel:

15
$$\begin{array}{lll} \text{Laserstrahl – Schnittquerschnitt} & L_s & = 8 \mu\text{m} \\ \text{Pixelgröße (kalibriert)} & P_k & = 1 \mu\text{m} \\ \text{Objektvergrößerung pro Dilatation} & D_{z=1} & = 2 \text{ Pixel (} z = \\ & & \text{Zyklenanzahl)} \end{array}$$

Benötigter Abstand des Lasers vom Objekt

20
$$L_{\text{Abstand}} = L_s / 2 = 4 \mu\text{m}$$

Benötigte Zyklenanzahl für die Dilatationen Z_D um gewünschten Laserabstand zu erreichen

25
$$Z_D = L_{\text{Abstand}} / P_k = 4 \text{ Dilatationszyklen}$$

D.h. nach 4 Dilatationszyklen wird eine virtuelle Objektgröße erreicht, deren Außenkontur den Laser in dem korrekten Abstand vom eigentlichen Objekt (vor der künstlichen Aufblähung) um das Objekt führen würde. Indem die Laserschnittlinien auf Basis der durch Dilatation entsprechend vergrößerten, virtuellen Objekte berechnet werden (wie oben beschrieben), bekommt beim Schnitt der Laserstrahl die gewünschte Entfernung vom Objektrand und

30

schneidet das Objekt sicher und ohne Verbrennung der Objektrandbereiche aus.

Ausführungsbeispiel 2:

- 5 In einem weiteren Ausführungsbeispiel wird die Vektorisierung der Schnittlinie zugrundegelegt, die zuvor nach dem oben benannten Verfahren zur automatischen Laserschnittlinienbestimmung errechnet wurde.

- 10 Nun wird jeder Punkt der Laserschnittlinie einer Skalierungstransformation unterzogen. Dies erfolgt derart, dass die gewünschte Vergrößerung der Laserschnittlinie erreicht wird und der Laserstrahl in sicherem Abstand um das Objekt herum geführt werden kann, um sicherzustellen, dass es unbeschädigt ausgeschnitten wird.

- 15 Im folgenden wird angenommen, dass die Laserschnittlinie bereits durch vorherige Bestimmung (automatisch oder manuell) bekannt ist. Die Laserschnittlinie besteht aus einer Schar von Punkten P_i mit Koordinaten (x_i, y_i) welche die Laserschnittlinie vollständig beschreiben. Bei Skalierung gilt für jeden Punkt P

20

$$x_i' = sx \cdot x_i$$

$$y_i' = sy \cdot y_i$$

- 25 wobei sx und sy Skalierungsfaktoren sind. In Vektornotation wird dies beschrieben als

$$P_i = \begin{pmatrix} x_i \\ y_i \end{pmatrix} \quad S = \begin{pmatrix} sx & 0 \\ 0 & sy \end{pmatrix} \quad P_i' = \begin{pmatrix} x_i' \\ y_i' \end{pmatrix} ,$$

- 30 wobei P_i der i -te Originalpunkt und P_i' der i -te skalierte Punkt der Laserschnittlinie ist. Somit lautet die Skalierungsgleichung

$$P'_i = S \cdot P_i$$

für alle Punkte i aus dem Intervall $[0, k]$ der Laserschnittlinie. Durch diese Vorgehensweise wird die Laserschnittlinie so skaliert, dass das Objekt in
5 sicherem Abstand geschnitten werden kann. Die durch diese Art der Skalierung bedingten Abstände der einzelnen Konturpunkte werden dadurch ausgeglichen, dass der Laserstrahl in Geraden von Punkt P_i zu Punkt P_{i+1} schneidet. Bei starken Vergrößerungen wird also die kontinuierlich verlaufende Laserschnittlinie durch ein Polygon angenähert,
10 indem die einzelnen Punkte P_i durch gerade Abschnitte der Laserschnittlinie verbunden werden.

Ferner können Abbildungsverzerrungen (Abberationen) durch eine geeignete ortsabhängige Adaption der Skalierungsmatrix kompensiert werden, also:
15

$$P'_i = S_i \cdot P_i$$

Transformation der Laserschnittlinien

Um die Schnittlinien an unterschiedliche Gegebenheiten anzupassen, wird
20 ausgenutzt, dass die automatisch errechnete Laserschnittlinie als eine Schar von Punkten $P_i = P(x_i, y_i)$ vorliegt. Indem man diese Punkte in eine neue Punkteschar transformiert, erreicht man beliebige Verzerrungen, Verschiebungen und Rotationen der Laserschnittlinie zum Zwecke der Kompensation von Fehlern beim Laserschnitt. Damit könnten beispielsweise
25 Abbildungsfehler der den Laserstrahl abbildenden Optik kompensiert werden. Im folgenden werden beispielhaft verschiedene Kompensationsverfahren beschrieben.

Fehlerkompensation oder Manipulation durch Translation

30 Die Schnittlinie wird um dx und dy verschoben. Die Werte für dx , dy ergeben sich aus den jeweils ermittelten Fehlern, bzw. aus den gewünschten Laserschnittlinienmanipulationen

$$x_i' = x_i + dx$$

$$y_i' = y_i + dy$$

5

$$P_i = \begin{pmatrix} x_i \\ y_i \end{pmatrix}$$

$$T = \begin{pmatrix} dx \\ dy \end{pmatrix}$$

$$P_i' = \begin{pmatrix} x_i' \\ y_i' \end{pmatrix}$$

oder kurz

$$P_i' = P_i + T$$

10

Verzerrungen können durch adaptive Translation, eben durch eine Ortsabhängigkeit des Translationswertes, kompensiert werden

$$P_i' = P_i + T_i$$

15

Durch diese Maßnahme können z.B. kleine Abweichungen in der Genauigkeit der Mikroskoptisch - Repositionierung gezielt kompensiert werden.

20

Fehlerkompensation oder Manipulation durch Skalierung

Die Schnittlinie wird um s_x und s_y skaliert. Die Werte für s_x , s_y ergeben sich aus den jeweils ermittelten Fehlern, bzw. aus den gewünschten Laserschnittlinienmanipulationen

25

$$x_i' = s_x \cdot x_i$$

$$y_i' = s_y \cdot y_i$$

$$P_i = \begin{pmatrix} x_i \\ y_i \end{pmatrix}$$

$$S = \begin{pmatrix} s_x & 0 \\ 0 & s_y \end{pmatrix}$$

$$P_i' = \begin{pmatrix} x_i' \\ y_i' \end{pmatrix}$$

oder kurz

$$P_i' = S \cdot P_i$$

- 5 Verzerrungen können durch adaptive Skalierung, eben durch eine Ortsabhängigkeit des Skalierungswertes, kompensiert werden:

$$P_i' = S_i \cdot P_i$$

- 10 Durch diese Maßnahme werden z.B. Verzerrungen durch Linsenfehler kompensiert. Es ergeben sich die folgenden Möglichkeiten der Laserschnittlinienbeeinflussung

$P_i(x_i)$	Skalierungswert s_x	$P_i'(x_i')$
falls $x_i > 0$	$s_x = 0$	x_i' liegt auf der y Achse
	$s_x = 1$	identische Abbildung
	$s_x = -1$	gespiegelt an y Achse
	$s_x > 1$	Dehnung
	$s_x < -1$	Dehnung und gespiegelt
	$s_x < 1$ UND $ s_x > 0$	Stauchung
	$s_x < 1$ UND $ s_x < 0$	Stauchung und gespiegelt
falls $x_i < 0$	$s_x = 0$	x_i' liegt auf der y Achse
	$s_x = 1$	identische Abbildung
	$s_x = -1$	gespiegelt an y Achse
	$s_x > 1$	Dehnung
	$s_x < -1$	Dehnung und gespiegelt
	$s_x < 1$ UND $ s_x > 0$	Stauchung
	$s_x < 1$ UND $ s_x < 0$	Stauchung und gespiegelt

Tab 1.7: Möglichkeiten zur Skalierung der Laserschnittlinie in x Richtung (y entsprechend)

Fehlerkompensation oder Manipulation durch Rotation

Die Schnittlinie wird um einen Winkel Θ gedreht. Der Wert für Θ ergibt sich aus den jeweils gewünschten Laserschnittlinienmanipulationen

5

$$x_i' = x_i \cdot \cos(\Theta) - y_i \cdot \sin(\Theta)$$

$$y_i' = x_i \cdot \sin(\Theta) + y_i \cdot \cos(\Theta)$$

10

$$P_i = \begin{pmatrix} x_i \\ y_i \end{pmatrix}$$

$$R = \begin{pmatrix} \cos(\Theta) & -\sin(\Theta) \\ \sin(\Theta) & \cos(\Theta) \end{pmatrix}$$

$$P_i' = \begin{pmatrix} x_i' \\ y_i' \end{pmatrix}$$

oder kurz

$$P_i' = R \cdot P_i$$

15

Verzerrungen können durch adaptive Drehung einzelner Laserschnittlinienpunkte, eben durch eine Ortsabhängigkeit des Drehwinkels, kompensiert werden

20

$$P_i' = R_i \cdot P_i$$

Durch diese Maßnahme werden z.B. Rotationsfehler kompensiert.

Manipulation der Laserschnittlinie durch die Komposition von

25

Transformationen

Die oben genannten Manipulationen zur Anpassung der berechneten Laserschnittlinie an die Gegebenheiten oder aber zum Zwecke der Fehlerkorrektur oder aber aus sonstigen Anpassungsgründen können auch durch die Komposition verschiedener Transformationen erreicht werden. Der

30

Vorteil liegt in der erhöhten Geschwindigkeit mit der komplexe Laserschnittlinien berechnet und manipuliert werden können.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung einer für die Ausübung des Verfahrens geeigneten Laser-Mikrodissektions-Vorrichtung weist diese eine geeignete Benutzerschnittstelle auf, die dem Benutzer eine leichte und für ihn

- 5 transparente Manipulation komplexer Abbildungen von Laserschnittmustern ermöglicht.

Dazu müssen die Transformationen in die 3x3 Matrixschreibweise überführt werden. Es gilt nunmehr für die Transformationen

10

Translation:

$$P_i = \begin{pmatrix} x_i \\ y_i \\ 1 \end{pmatrix} \quad T = \begin{pmatrix} 1 & 0 & dx \\ 0 & 1 & dy \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad P_i' = \begin{pmatrix} x_i' \\ y_i' \\ 1 \end{pmatrix}$$

- 15 Skalierung:

$$P_i = \begin{pmatrix} x_i \\ y_i \\ 1 \end{pmatrix} \quad S = \begin{pmatrix} sx & 0 & 0 \\ 0 & sy & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad P_i' = \begin{pmatrix} x_i' \\ y_i' \\ 1 \end{pmatrix}$$

Rotation:

20

$$P_i = \begin{pmatrix} x_i \\ y_i \\ 1 \end{pmatrix} \quad R = \begin{pmatrix} \cos \Theta & -\sin \Theta & 0 \\ \sin \Theta & \cos \Theta & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad P_i' = \begin{pmatrix} x_i' \\ y_i' \\ 1 \end{pmatrix}$$

Kompositionsbeispiele:

25

$$P_i' = T_1 \cdot T_2 \cdot P_i \quad (\text{zwei Translationen werden}$$

ausgeführt)

$$P_i' = S_1 \cdot S_2 \cdot P_i \quad (\text{zwei Skalierungen werden}$$

ausgeführt)

$$P_i' = R_1 \cdot R_2 \cdot P_i \quad (\text{zwei Rotationen werden}$$

ausgeführt)

5
$$P_i' = S_1 \cdot T_1 \cdot R_1 \cdot P_i \quad (\text{Rotation, Translation, Skalierung}$$

wird ausgeführt)

10 Durch Kombination der Transformationen kann die zuvor automatisch
gefundene oder bereits auf anderem Wege bekannte Laserschnittlinie, wenn
sie nur bekannt ist als eine Schar von Punkten mit $P_i = P(x_i, y_i)$, in beliebiger
Weise rotiert, skaliert und verschoben werden. Insbesondere lassen sich
gleiche Schnittmuster wiederholen, um so ein Array von gleichartigen
Schnittmustern auszuschneiden.

15 Es ist ferner möglich, die einzelnen Transformationen per Matrixmultiplikation
zu kombinieren (wobei die Kombinationsreihenfolge im allgemeinen nicht
kommutativ ist).

20 Die Darstellung der Laserschnittlinie als eine Punkteschar ermöglicht also die
Nutzung aller bekannten Operationen aus der Linearen Algebra um die
Laserschnittmuster auf einfachste Weise und in einer für dem Benutzer in
höchstem Maße verständliche und transparente Weise darzustellen.

25 **Fig. 2** zeigt ein Laser-Mikro-Dissektionsgerät zur Durchführung des
erfindungsgemäßen Verfahrens, welches in dieser beispielhaften
Ausgestaltung beim Schneiden einen Laserstrahl über eine festgehaltene
Probe bewegt. In einer anderen Ausführungsform (nicht dargestellt) wird der
Laserstrahl ortsfest gehalten und das Präparat relativ dazu bewegt.

30 Das Laser-Mikro-Dissektionsgerät umfasst ein Mikroskop 1 mit einem
verfahrbaren x-y-Tisch 2, auf dem ein Präparatehalter 3 angeordnet ist. In
dieser Ausführungsform wird ein aufrechtes Mikroskop verwendet. Es ist
jedoch auch möglich, dafür einen Aufbau mit einem inversen Mikroskop zu

benutzen.

An der Unterseite des Präparatehalters 3 befindet sich ein Präparat 4, aus dem ein Objekt ausgeschnitten werden soll. Unter dem x-y-Tisch 2 sind ein Beleuchtungssystem 5 und ein Kondensor 11 angeordnet, der das Präparat 4
5 beleuchtet. Der x-y-Tisch 2 wird in dieser Ausführungsform während des Schneidvorgangs horizontal, also in x-Richtung und in y-Richtung, nicht verfahren. Unterhalb des Präparats 4 ist mindestens ein Auffangbehältnis 19 zum Auffangen des ausgeschnittenen Dissektats angeordnet.

10 Von einem Laser 6, in diesem Beispiel ein UV-Laser, geht ein Laserstrahl 7 aus, der in einen Beleuchtungsstrahlengang 20 eingekoppelt wird. In dem Beleuchtungsstrahlengang 20 ist eine Laser-Scan-Einrichtung 22 angeordnet. Der Laserstrahl 7 durchläuft die Laser-Scan-Einrichtung 22 und gelangt über ein optisches System 13 zu einem Objektiv 9, das den Laserstrahl 7 auf das
15 Präparat 4 fokussiert. Das optische System 13 ist mit Vorteil als dichromatischer Teiler ausgeführt, durch den ein von dem Präparat 4 durch das Objektiv 9 ausgehender Abbildungsstrahlengang 21 zu mindestens einem Okular 12 gelangt.

20 Die Einstellung der Laser-Scan-Einrichtung 22 und damit die Verstellung des Laserstrahls 7 auf dem Präparat 4 erfolgt in dieser Ausführungsform mit einem der Laser-Scan-Einrichtung 22 zugeordneten Motor 23, einer Steuerungseinheit 24 und einem Rechner 16. Der Motor 23 ist mit der Steuerungseinheit 24 verbundenen, welche die Steuersignale zur Ansteuerung des Motors 23 liefert. Die Steuerungseinheit 24 ist mit dem Rechner 16 verbunden, an den ein Monitor 18 angeschlossen ist. Auf dem
25 Monitor 18 wird ein von einer Kamera 17 aufgenommener Bildausschnitt des Präparats 4 dargestellt. Mittels einer Rechner-Maus (nicht dargestellt) oder einer anderen beliebigen Cursorsteuerungseinrichtung kann auf dem Monitor 18 in dem Kamerabild eine gewünschte Soll-Schnittlinie definiert werden. Der Rechner 16 ist außerdem mit der Laserlichtquelle 6 verbunden und liefert
30 dieser nur dann Triggersignale zum Auslösen von Laserimpulsen, wenn ein Schnitt durchgeführt wird.

Die Laser-Scan-Einrichtung 22 selbst dient als Schnittlinien-
Steuerungseinheit, die während des Schneidvorgangs eine Relativbewegung
zwischen dem Laserstrahl 7 und dem Präparat 4 erzeugt. Die Fokussierung
des Laserstrahls 7 kann durch manuelles Verfahren des x-y-Tisches 2 in der
5 Höhe bei gleichzeitiger visueller Kontrolle des Kamerabildes durch einen
Benutzer erfolgen. Bedienungsfreundlicher ist jedoch eine Ausführungsform
der Vorrichtung, die eine Autofokus-Vorrichtung (nicht dargestellt) für den
Laserstrahl 7 umfasst.

10 Durch Ansteuerung der Laser-Scan-Einrichtung 22 erscheint der Laserstrahl 7
am Ausgang der Laser-Scan-Einrichtung 22 unter verschiedenen
Ablenk winkeln. Dabei kann der Laserstrahl 7 durch Variation des
Ablenk winkels auf beliebige Positionen auf dem Präparat 4 geführt werden,
die innerhalb des Sehfeldes des Objektivs 10 liegen.

15 Auf dem Rechner 16 ist eine Bildanalyse-Software installiert, mit welcher das
von der Kamera 17 aufgenommene Bild bearbeitet und mindestens ein
auszuschneidendes Objekt entsprechend dem erfindungsgemäßen Verfahren
automatisch in dem Bild ermittelt wird. Danach wird zu dem Objekt
automatisch eine Soll-Schnittlinie, die das Objekt umgibt, ermittelt.

20 Die Schnittbreite eines Lasers in einer Probe hängt ab von den
Laserparametern, wie z.B. Laserleistung und Apertur des Laserstrahls 7.
Entsprechend der aktuellen eingestellten Schnittbreite wird zu der
verfahrensgemäß automatisch bestimmten Soll-Schnittlinie eine Anzahl von
Sollpositionen des Laserstrahls auf der Probe 4 berechnet, wobei die
aneinander gereihten Sollpositionen des Laserstrahls 7 die gewünschte Soll-
25 Schnittlinie ergeben.

Dann werden auf der Probe 4 nacheinander die Sollpositionen mit der Laser-
Scan-Einrichtung 22 angefahren. Jedes Mal, wenn die Sollposition des
Laserstrahls 7 auf der Probe 4 mittels der Laser-Scan-Einrichtung 22
vorbereitet bzw. eingestellt wurde, liefert der Rechner 16 Triggersignale zum
30 Auslösen von Laserpulsen an die Laserlichtquelle 6. Auf diese Weise wird
schrittweise der Laserschnitt im Präparat erzeugt.

Nach Beendigung der Laserschnitts ist das Dissektat von dem umgebenden Präparat 4 vollständig getrennt und fällt in dieser Anordnung unter Einwirkung der Schwerkraft in das darunter angeordnete Auffangbehältnis 19.

5 Spezielle Ausgestaltungen des Verfahrens

Nachfolgend werden noch verschiedene spezielle Ausgestaltungen des Verfahrens angegeben.

Eine weitere Ausgestaltung des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich eine automatische Shadingkorrektur vorgesehen ist mit

10 folgenden Schritten:

- Manuelle oder automatische Positionierung des Mikroskoptisches an einer Position, die eventuell zuvor eingelernt wurde, die es erlaubt, ein Leerbild, also ein Bild der inhomogenen Beleuchtung aufzunehmen;
- Abspeichern dieses Shadingkorrekturbildes als reversibles
15 Bilddatenformat (TIF = Tagged Image File (Bildformat), BMP = Bitmap (Bildformat) etc.)
- Anwendung des gespeicherten Shadingbildes auf die nachfolgenden Bilder, bei denen Objekte erkannt werden sollen und wo diese Objekte per Laserstrahl ausgeschnitten werden sollen, zum Zwecke der
20 Beseitigung der durch die inhomogene Beleuchtung hervorgerufenen Bildverfälschung.

Eine weitere Ausgestaltung des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich eine automatische und manuelle Objektdetektion

25 auszuschneidenden Objekte vorgesehen ist mit folgenden Schritten:

- Mittels eines geeigneten Verfahrens ein möglichst günstiger Schwellenwert in das Histogramm gelegt wird und damit ein optimales Binärbild erzeugt wird welches ein Größtmass an Informationen über die per Laser auszuschneidenden Objekte enthält;
- 30 - Durch ein Entropiemaximierungsverfahren den optimalen

Schwellenwert eine automatische Binärbilderzeugung vornimmt;

- Durch manuell einstellbare Schwellwerte eine Binärbilderzeugung vornimmt;
- Dass die Schwellenwerte auf geeigneten Datenträgern gespeichert und wieder aufgerufen werden können, so dass eine wiederholte Objektbinärisierung für das Laserschnittverfahren vorgenommen werden kann.

10 Eine weitere Ausgestaltung des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich eine Beseitigung von kleineren Objekten, die per Laserschnittverfahren nicht mehr ausgeschnitten werden sollten, vorgesehen ist mit folgenden Schritten:

- Kleinere Objekte durch bildanalytische Morphologie, im speziellen durch Erosion, aus dem Binärbild entfernt werden;
- 15 - Das über die Anzahl der Erosionszyklen ein Maß für die Größe der Objekte eingestellt werden kann, die aus dem Laserschnittverfahren ausgeschlossen werden sollen;
- Das durch formgebende Faktoren, also durch Ausnutzung der Morphologie der verwendeten bildanalytischen Operatoren bestimmte Objektformen von dem Laserschnittverfahren ausgeschlossen werden können indem man diese Objekte aus dem Binärbild filtert.

25 Eine weitere Ausgestaltung des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich eine Verhinderung des Durchschneidens zu eng benachbarter Objekte im Präparat vorgesehen ist mit folgenden Schritten:

- Zu eng benachbarte Bildobjekte, die per Laser ausgeschnitten werden sollen, zu einem Cluster zusammengefasst werden, derart, dass der Laserschnitt um alle Teilchen außen herum geführt wird und somit der gesamte, zusammenhängende Bereich aus Objekten von Interesse ausgeschnitten wird und somit kein Objekt von Interesse „durchschnitten“ wird;
- 30 - Dass mathematische Morphologie eingesetzt wird um die

Außenkonturlinie für den Laserschnitt zu bestimmen

Eine weitere Ausgestaltung des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich ein Ausschneiden von größeren Löchern in Clustern von

5 Objekten von Interesse vorgesehen ist mit folgenden Schritten:

- dass mehrere Schnittlinien, im speziellen zwei Schnittlinien, berechnet werden, derart, dass n Schnittlinien das Loch oder die Löcher kennzeichnen und m Schnittlinien das Objekt oder die Objekte von Interesse kennzeichnen;
- 10 - Dass eine bestimmte Schnittreihenfolge benutzt wird, um die Löcher von den Objekten von Interesse zu trennen, indem man zunächst innen liegende Löcher und dann die eigentlichen Objekte von Interesse ausschneidet;
- Dass die Löcher als „Abfall“ in anderen Auffangbehältern als die
- 15 eigentlichen Exponate der Objekte von Interesse gesammelt werden um den Reinheitsgrad der Proben zu erhöhen.

Eine weitere Ausgestaltung des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich ein automatisches Erfassen und Ausschneiden verschiedener

20 Objekte im Präparat auf Basis einer Merkmalsextraktion vorgesehen ist mit folgenden Schritten:

- Die Merkmale einer Schar von Objekten in einem Bild vermessen werden, derart, dass eine Laserdissektion möglich wird;
- Dass die Merkmale der gemessenen Objekte mit vorgegebenen
- 25 Wertebereichen, welche individuell zu jedem Merkmal vorgegeben werden, verglichen werden;
- Dass die Wertebereiche, die zum Erkennen und Klassifizieren der Objekte herangezogen werden, in jeglicher Weise gespeichert und geladen und somit ausgetauscht werden können; hierbei kommen als
- 30 Speichermedium alle elektronischen Datenträger, Netzwerke, das Internet, geschriebene Dokumente, gesprochene Kommandos etc. in Frage;

- Dass die Wertebereiche, die zum erkennen und Klassifizieren der Objekte herangezogen werden, in Datenbanken gespeichert und geladen werden können;
- 5 - Dass die Wertebereiche, die zum erkennen und Klassifizieren der Objekte herangezogen werden, durch externe Manipulation in Datenbanken oder durch externe Programme geändert und angepasst werden können;
- 10 - Dass die Wertebereiche, die zum Erkennen und Klassifizieren der Objekte herangezogen werden, auch dazu dienen können, mehrere automatische Laserschneidsysteme in einem System-Cluster zu synchronisieren, derart, das alle Maschinen unter gleichen Bedingungen arbeiten; Der System-Cluster kann dabei über ein lokales Netzwerk, LAN, WLAN, Bluetooth, Internet, Intranet etc. erfolgen;
- 15 - Dass ein beliebiger Vergleichsformalismus mit dem Ziel einer Kombination der Einzelvergleiche der gemessenen Objektmerkmalsdaten mit den individuell vorgegebenen Wertebereichen eine eindeutige Identifizierung eines Präparatobjektes erlaubt;
- 20 - Dass verschiedene Objekte anhand individueller Merkmalsdatensätze erkannt werden können;
- Dass in einem Arbeitsgang verschiedene Objekte aus dem Präparat ausgeschnitten werden können und in individuell und automatisch bereitgestellten Auffangbehältern für das Schnittgut gesammelt werden können;
- 25 - Dass Objekte, die den Bildrand „berühren“, per Bildanalyse identifiziert werden und dann nicht von dem Laser ausgeschnitten werden. Somit wird verhindert, dass der unvollständige Bereich ausgeschnitten wird. Es wird erreicht, das immer nur vollständig im Bild befindliche Objekte dem Laserschnitt zugeführt werden.

30

Eine weitere Ausgestaltung des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich eine automatische Bestimmung von Laserschnittlinien um Bildobjekte vorgesehen ist mit folgenden Schritten:

- Dass ein bildgebendes Verfahren, z.B. mittels einer Kamera, einen Präparateauschnitt geeignet darbietet, so dass auf Basis dieses Bildes unter Verwendung von Bildanalyse die Laserschnittlinie automatisch bestimmt werden kann;
- 5 - Eine Kontrolle der Ergebnisse durch Einblenden der automatisch gefundenen Schnittlinien mittels einer Abbildungsvorrichtung ermöglicht wird;
- Dass die Objektkonturen über eine Kodierung der Kontur der Objekte beschrieben wird, derart, dass die Konturbeschreibung, die aus einer Bildanalyse automatisch oder teilautomatisch erfolgt, direkt auf die Laserschnittkoordinaten abgebildet werden kann;
- 10 - Dass ein Lernverfahren die benötigten Wertebereiche zur Klassifikation von den Objekten, die per Laser ausgeschnitten werden, automatisch oder manuell aufnehmen kann, derart, dass die Wertebereiche mittels einer Software eingegeben werden oder mittels einer geeigneten Markierung des Objektes, z.B. durch einen Mausklick, automatisch erfasst werden;
- 15 - Dass Objekte, die den Bildrand berühren und daher nicht mehr vollständig per Laser ausgeschnitten werden können, bei Bedarf ignoriert werden können, derart, dass bei der Objektidentifikation erkannt wird, ob ein Objekt den Bildrand berührt oder nicht, und dann in Abhängigkeit des Analyseergebnisses vor den weiteren Prozessschritten ausgeblendet wird oder nicht;
- 20 - Dass eine Unabhängigkeit von der Laserwellenlänge erreicht wird, dadurch, dass die automatische Klassifikation und die Berechnung der Laserschnittlinie durch den Einsatz von laserwellenlängen - unabhängigen, bildgebenden Verfahren erreicht wird;
- 25 - Dass durch geeignete Skalierung der Laserschnittlinie erreicht wird, dass die Objekt-Klassifikation und die Laserschnittlinienbestimmung bei niedriger Vergrößerung vorgenommen werden kann und dadurch ein größeres Sehfeld zur Verfügung steht, welches mehr Objekte zu detektieren gestattet, und dass dann der eigentliche Ausschneideprozess bei einer höheren Vergrößerung vorgenommen
- 30

wird;

- Dass durch den Einsatz von Piezoaktoren für die x-y-Verschiebung die Genauigkeit des Laserschnittes erhöht werden kann;
- Dass durch die Verwendung von x-y-Verstelleinrichtungen die Objekte und dessen Laserschnittlinie in der Nähe der optischen Achse positioniert werden, um so optimale Schneidbedingungen zu bekommen;
- Dabei wird der Ausschneideprozess von der Ablenkeinheit in der Auflichtachse des Mikroskops vorgenommen, während der Tisch die auszuschneidenden Objekte automatisch nahe der optischen Achse positioniert;
- Dass durch den Einsatz einer geeigneten Linearkombination von Bewegungen durch Mikroskoptisch, x-y-Piezotranslator und Ablenkeinheit für den Laserschnitt eine Vergrößerung der Schnittgeschwindigkeit bei gleichzeitiger Erhöhung der Schnittpräzision erfolgt;
- Dass durch den Einsatz eines Autofokus der schneidende Laserstrahl immer in die optimale Schnittposition gebracht wird und daher ein automatisierter Ausschneideprozess von beliebig vielen Objekten ohne Überwachung durch einen Benutzer erfolgt;
- Dass die Geschwindigkeit des Systems durch den Einsatz eines Autofokus in Verbindung mit einem z-Piezotranslator, derart, das der z-Piezotranslator direkt das Objektiv in z-Richtung verstellt, wesentlich erhöht wird und daher ein automatisierter Ausschneideprozess von beliebig vielen Objekten ohne Überwachung durch einen Benutzer erfolgen kann.

Eine weitere Ausgestaltung des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich eine automatische Abstandsveränderung der Laserschnittlinie vom Objekt zum Zwecke des artefaktfreien Ausschneidens vorgesehen ist mit folgenden Schritten:

- Die Koordinaten der einzelnen Punkte der Soll-Schnittlinie werden durch eine geeignete bildanalytische Bearbeitung der Bildobjekte vor

der eigentlichen Laser-Schnittlinienbestimmung so bearbeitet, dass die bearbeitete Soll-Schnittlinie in größerem Abstand vom segmentierten Objekt verläuft;

- 5 - Vorzugsweise erfolgt eine Dilatation des Binärbildes des segmentierten Objektes vor der Schnittlinienberechnung, so dass ein determiniertes Vergrößern des Objektes um die gewünschte Anzahl von Pixeln durchgeführt wird;
- Die vergrößerten Objekte dienen sodann als Grundlage der Laser-Schnittlinienberechnung wie vorab beschrieben;
- 10 - Die Koordinaten der einzelnen Punkte der Laserschnittlinie werden durch eine geeignete Skalierungstransformation vergrößert, so dass beim eigentlichen Laserschnitt der Laserstrahl in gesicherter Entfernung um das Objekt herumgeführt wird;
- Dass der Laserabstand durch ein Softwareinterface durch den Benutzer eingestellt wird, um z.B. dem Benutzer das Testen von
- 15 Systemeinstellungen zu erlauben insbesondere in Hinblick auf die Prozessautomatisierung;
- Dass der Laserabstand automatisch berechnet wird und eingestellt wird, um so vollautomatische Prozesse zu ermöglichen.

20

Eine weitere Ausgestaltung des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich ein Ausgleich von Verzerrungen bei der Abbildung vorgesehen ist mit folgenden Schritten:

- Der Skalierungsfaktor wird ortsabhängig formuliert und
- 25 - somit wird jeder Laserschnittlinien-Konturpunkt individuell so verzerrt, dass eine Kompensation von Abbildungsfehlern erfolgt.

Eine weitere Ausgestaltung des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich eine Manipulation, Linearkombination und

30 Fehlerkompensation der Laserschnittlinien, die zuvor automatisch oder manuell oder von einem Datenträger eingelesen wurden, vorgesehen ist mit

folgenden Schritten:

- Auf die nach obigem Verfahren errechneten Laserschnittlinien wird eine Matrixtransformation zum Zwecke der Translation aller Laserschnittlinienpunkte um einen bestimmten Betrag in x und y Richtung angewendet;
5
- Auf die nach obigem Verfahren errechneten Laserschnittlinien wird eine Matrixtransformation zum Zwecke der Skalierung aller Laserschnittlinienpunkte um einen bestimmten Betrag in x- und y-Richtung angewendet;
- 10 - Auf die nach obigem Verfahren errechneten Laserschnittlinien wird eine Matrixtransformation zum Zwecke der Rotation aller Laserschnittlinienpunkte um einen bestimmten Betrag in x- und y-Richtung angewendet;
- 15 - Auf die nach obigem Verfahren errechneten Laserschnittlinien wird eine beliebige Kombination von Matrixtransformationen zum Zwecke der schrittweisen Translation, Skalierung und Rotation aller Laserschnittlinienpunkte um einen bestimmten Betrag in x- und y-Richtung angewendet;
- 20 - Durch Einsatz von Matrixtransformationen werden, speziell der Translationsmatrix, ungenaue Mikroskoptisch-Repositionierungen (=Wiederauffinden von Mikroskoptisch-Positionen) kompensiert, indem die ermittelte Laserschnittlinie um einem bestimmten Betrag dx , dy , welcher dem Ungenauigkeitsbetrag der Tischrepositionierung entspricht, korrigiert wird;
- 25 - Die Kompensationen werden durch direkte Manipulation der Koordinatenmatrix eines Laserschnittlinien-Musters durchgeführt, also ohne aktive Tischbewegung, sondern werden allein durch die Ablenkeinheit des Lasers in der Auflichtachse des Mikroskops bewerkstelligt;
- 30 - wiederholen beliebig vieler Laserschnittlinien-Muster, indem ein Array von Laserschnittlinien per zyklisch wiederholter Matrixtransformation in beliebigen Mustern erzeugt wird; dies ermöglicht eine statistische Entnahme großer, gleichartig geformter Proben aus einer Probe;

- Dass die Manipulationsfaktoren, Linearkombinationen und Fehlerkompensationsfaktoren in einer geeigneten Weise auf elektronischen Datenträgern oder in Datenbanken etc. abgespeichert und wieder aufgerufen werden.

Bezugszeichenliste

- | | |
|----|------------------------------|
| | 1. Mikroskop |
| | 2. verfahrbarer x-y-Tisch |
| | 3. Präparatehalter |
| 5 | 4. Präparat |
| | 5. Beleuchtungssystem |
| | 6. Laser |
| | 7. Laserstrahl |
| | 8. Mikroskopstativ |
| 10 | 9. Objektiv |
| | 10. optische Achse |
| | 11. Kondensor |
| | 12. Okular |
| | 13. optisches System |
| 15 | 14. Blende |
| | 15. Blenden-Motor |
| | 16. Rechner |
| | 17. Kamera |
| | 18. Monitor |
| 20 | 19. Auffangbehälter |
| | 20. Beleuchtungsstrahlengang |
| | 21. Abbildungsstrahlengang |
| | 22. Laser-Scan-Einrichtung |
| | 23. Motor für Laser-Scan- |
| 25 | Einrichtung |
| | 24. Steuerungseinheit |

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur Laser-Mikrodissektion, bei dem zu einem auszuscheidenden Objekt in einem mikroskopischen Präparat eine Soll-Schnittlinie markiert und anschließend das Objekt mittels einer Relativbewegung zwischen Laserstrahl und Präparat ausgeschnitten wird,
dadurch gekennzeichnet,
- 10 - dass ein elektronisches Bild zumindest eines Bildausschnittes des Präparats aufgenommen wird,
- dass der Bildausschnitt bildanalytisch bearbeitet wird, wobei mindestens ein auszuscheidende Objekt automatisch ermittelt wird,
- und dass die Soll-Schnittlinie um das mindestens ein
15 auszuscheidende Objekt automatisch bestimmt wird.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,**
dass das Ermitteln eines oder mehrerer Objekte durch Segmentation des elektronischen Bildes erfolgt,
- indem auf der Basis des elektronischen Bildes eine Grauwert-Schwelle definiert wird,
- und indem das elektronische Bild durch Vergleich mit der Grauwert-Schwelle in ein Binärbild überführt wird, in welchem nur noch die segmentierten Objekte enthalten sind.
- 25 3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet,**
dass das elektronische Bild entweder ein Graubild oder ein Farbbild ist.

4. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**,
- dass zur Ermittlung des auszuschneidenden Objekts bestimmte Klassifikationsmerkmale vordefiniert werden, welche das Objekt charakterisieren,
- 5
- dass bildanalytisch die tatsächlich vorhandenen Objektmerkmale des segmentierten Objekts bestimmt und mit den Klassifikationsmerkmalen verglichen werden,
 - und dass bei Übereinstimmung der Objektmerkmale mit den Klassifikationsmerkmalen das Objekt klassifiziert wird.
- 10
5. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**,
- dass zu den klassifizierten Objekten eine Soll-Schnittlinie bestimmt wird und dass nicht klassifizierte Objekte von der Bestimmung einer Soll-Schnittlinie ausgeschlossen werden.
- 15
6. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**,
- dass für unterschiedliche Typen von Objekten unterschiedliche Gruppen von Klassifikationsmerkmalen vordefiniert werden, welche die unterschiedlichen Objekttypen charakterisieren,
 - dass bildanalytisch die tatsächlich vorhandenen Objektmerkmale jedes Objekts bestimmt und mit den unterschiedlichen Gruppen von Klassifikationsmerkmalen verglichen werden,
- 20
- und dass bei Übereinstimmung der Objektmerkmale mit einer bestimmten Gruppe von Klassifikationsmerkmalen das Objekt dem durch die Klassifikationsmerkmale definierten Objekttyp zugeordnet wird.
- 25
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**,
- dass mehrere, dicht zusammenliegende segmentierte Objekte desselben Objekttyps zu einem sogenannten Cluster zusammengefasst werden, und
- 30
- dass eine einzige gemeinsame Soll-Schnittlinie, die das Cluster umschließt, automatisch bestimmt wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 7, **dadurch gekennzeichnet**,
- dass in einem zusätzlichen Verfahrensschritt die automatisch bestimmte Soll-Schnittlinie durch eine mathematische Transformation auf eine Laserschnittlinie abgebildet wird,
 - dass diese Laserschnittlinie in eine Relativbewegung zwischen Laserstrahl und Präparat umgesetzt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass zur automatischen Erzeugung der Laserschnittlinie folgende Verfahrensschritte vorgenommen werden:
- bildanalytische Bestimmung der Außenkontur des auszu schneidenden Objekts oder Clusters,
 - Umsetzung der Außenkontur in einen numerischen Code, der die Soll-Schnittlinie angibt,
 - und Transformieren der Soll-Schnittlinie in die Laserschnittlinie.
10. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass der numerische Code die Außenkontur des Objekts relativ zu einem auf das Laser-Mikrodissektion-System bezogenen Koordinatensystem angibt.
11. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass der numerische Code die Außenkontur des Objekts relativ zu einem auf einen das Präparat tragenden Präparatehalter bezogenen Koordinatensystem angibt.
12. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass als numerischer Code ein Freeman-Code oder ein Kettencode angegeben wird.

13. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**,

dass zusätzlich eine automatische Shadingkorrektur vorgesehen ist mit folgenden Schritten:

- 5 • Manuelle oder automatische Positionierung des
Mikroskoptisches an einer Position, die eventuell zuvor
eingelernt wurde, die es erlaubt, ein Leerbild, also ein Bild der
inhomogenen Beleuchtung aufzunehmen,
- 10 • Abspeichern dieses Shadingkorrekturbildes als reversibles
Bilddatenformat (TIF = Tagged Image File (Bildformat), BMP =
Bitmap (Bildformat) etc.),
- 15 • Anwendung des gespeicherten Shadingbildes auf die
nachfolgenden Bilder, bei denen Objekte erkannt werden sollen
und wo diese Objekte per Laserstrahl ausgeschnitten werden
sollen, zum Zwecke der Beseitigung der durch die inhomogene
Beleuchtung hervorgerufenen Bildverfälschung.

14. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**,

dass zusätzlich eine automatische und manuelle Objektdetektion der
auszuschneidenden Objekte vorgesehen ist mit folgenden Schritten:

- 20 • Mittels eines geeigneten Verfahrens ein möglichst günstiger
Schwellenwert in das Histogramm gelegt wird und damit ein
optimales Binärbild erzeugt wird welches ein Größtmass an
Informationen über die per Laser auszuschneidenden Objekte
enthält;
- 25 • Durch ein Entropiemaximierungsverfahren den optimalen
Schwellenwert eine automatische Binärbilderzeugung
vornimmt;
- 30 • Durch manuell einstellbare Schwellwerte eine
Binärbilderzeugung vornimmt;
- Dass die Schwellenwerte auf geeigneten Datenträgern
gespeichert und wieder aufgerufen werden können, so dass
eine wiederholte Objektbinärisierung für das
Laserschnittverfahren vorgenommen werden kann.

15. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**,
dass zusätzlich eine Beseitigung von kleineren Objekten, die per Laserschnittverfahren nicht mehr ausgeschnitten werden sollten, vorgesehen ist mit folgenden Schritten:

- 5
- Kleinere Objekte durch bildanalytische Morphologie, im speziellen durch Erosion, aus dem Binärbild entfernt werden,
 - Das über die Anzahl der Erosionszyklen ein Maß für die Größe der Objekte eingestellt werden kann, die aus dem Laserschnittverfahren ausgeschlossen werden sollen,
- 10
- Das durch formgebende Faktoren, also durch Ausnutzung der Morphologie der verwendeten bildanalytischen Operatoren bestimmte Objektformen von dem Laserschnittverfahren ausgeschlossen werden können indem man diese Objekte aus dem Binärbild filtert.

15 16. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**,
dass zusätzlich eine Verhinderung des Durchschneidens zu eng benachbarter Objekte im Präparat vorgesehen ist mit folgenden Schritten:

- 20
- Zu eng benachbarte Bildobjekte, die per Laser ausgeschnitten werden sollen, zu einem Cluster zusammengefasst werden, derart, das der Laserschnitt um alle Teilchen außer herum geführt wird und somit der gesamte, zusammenhängende Bereich aus Objekten von Interesse ausgeschnitten wird und somit kein Objekt von Interesse „durchschnitten“ wird,
- 25
- Dass mathematische Morphologie eingesetzt wird um die Außenkonturlinie für den Laserschnitt zu bestimmen:

17. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**,

dass zusätzlich ein Ausschneiden von größeren Löchern in Clustern von Objekten von Interesse vorgesehen ist mit folgenden Schritten:

- 5 • mehrere Schnittlinien, im speziellen zwei Schnittlinien berechnet werden, derart, dass n Schnittlinien das oder die Löcher kennzeichnen und m Schnittlinien das oder die Objekte von Interesse kennzeichnen;
- 10 • Dass eine bestimmte Schnittreihenfolge benutzt wird um die Löcher von den Objekten von Interesse zu trennen, indem man zunächst innen liegende Löcher und dann die eigentlichen Objekte von Interesse ausschneidet;
- 15 • Dass die Löcher als „Abfall“ in anderen Auffangbehältern als die eigentlichen Exponate der Objekte von Interesse gesammelt werden um den Reinheitsgrad der Proben zu erhöhen.

18. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**,

dass zusätzlich ein automatisches Erfassen und Ausschneiden verschiedener Objekte im Präparat auf Basis einer Merkmalsextraktion vorgesehen ist mit folgenden Schritten:

- 20 • Die Merkmale einer Schar von Objekten in einem Bild vermessen werden, derart, dass eine Laserdissektion möglich wird;
- 25 • Dass die Merkmale der gemessenen Objekte mit vorgegebenen Wertebereichen, welche individuell zu jedem Merkmal vorgegeben werden, verglichen werden;
- 30 • Dass die Wertebereiche, die zum erkennen und Klassifizieren der Objekte herangezogen werden, in jeglicher Weise gespeichert und geladen und somit ausgetauscht werden können. Als Speichermedium kommen alle elektronischen Datenträger, Netzwerke, das Internet, geschriebene Dokumente, gesprochene Kommandos etc. in Frage;
- Dass die Wertebereiche, die zum Erkennen und Klassifizieren

der Objekte herangezogen werden, in Datenbanken gespeichert und geladen werden können;

5

- Dass die Wertebereiche, die zum erkennen und Klassifizieren der Objekte herangezogen werden, durch externe Manipulation in Datenbanken oder durch externe Programme geändert und angepasst werden können;

10

- Dass die Wertebereiche, die zum erkennen und Klassifizieren der Objekte herangezogen werden, auch dazu dienen können, mehrere automatische Laserschneidsysteme in einem Cluster zu synchronisieren, derart, das alle Maschinen unter gleichen Bedingungen arbeiten. Der Cluster kann dabei über ein lokales Netzwerk, LAN, WLAN, Bluetooth, Internet, Intranet etc. erfolgen;

15

- Dass ein beliebiger Vergleichsformalismus mit dem Ziel einer Kombination der Einzelvergleiche der gemessenen Objektmerkmalsdaten mit den individuell vorgegebenen Wertebereichen eine eindeutige Identifizierung eines Präparatobjektes erlaubt;

20

- Das verschiedene Objekte anhand individueller Merkmalsdatensätze erkannt werden können;
- Das in einem Arbeitsgang verschiedene Objekte aus dem Präparat ausgeschnitten werden können und in individuell und automatisch bereitgestellten Auffangbehältern für das Schnittgut gesammelt werden können;

25

- Das Objekte, die den Bildrand „berühren“, per Bildanalyse identifiziert werden und dann nicht von dem Laser ausgeschnitten werden. Somit wird verhindert, dass der unvollständige Bereich ausgeschnitten wird. Es wird erreicht, das immer nur vollständig im Bild befindliche Objekte dem Laserschnitt zugeführt werden.

30

19. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**,
dass zusätzlich eine automatische Bestimmung von Laserschnittlinien
um Bildobjekte vorgesehen ist mit folgenden Schritten:

- 5 • dass ein bildgebendes Verfahren, z.B. mittels einer Kamera,
einen Präparateauschnitt geeignet darbietet, so dass auf Basis
dieses Bildes unter Verwendung von Bildanalyse die
Laserschnittlinie automatisch bestimmt wird;
- 10 • Eine Kontrolle der Ergebnisse durch Einblenden der
automatisch gefundenen Schnittlinien mittels einer
Abbildungsvorrichtung ermöglicht wird;
- 15 • Dass die Objektkonturen über eine Kodierung der Kontur der
Objekte beschrieben wird, derart, das die Konturbeschreibung,
die aus einer Bildanalyse automatisch oder teilautomatisch
erfolgt, direkt auf die Laserschnittkoordinaten abgebildet
werden kann;
- 20 • Ein Lernverfahren die benötigten Wertebereiche zur
Klassifikation von den Objekten, die per Laser ausgeschnitten
werden, automatisch oder manuell aufnehmen kann, derart,
das die Wertebereiche mittels einer Software eingegeben
werden oder mittels einer geeigneten Markierung des Objektes,
z.B. durch einen Mausklick, automatisch erfasst werden kann;
- 25 • Dass Objekte, die den Bildrand berühren und daher nicht mehr
vollständig per Laser ausgeschnitten werden können, bei
Bedarf ignoriert werden können, derart, das bei der
Objektidentifikation erkannt wird, ob ein Objekt den Bildrand
berührt oder nicht und dann in Abhängigkeit des
Analyseergebnisses vor den weiteren Prozessschritten
ausgeblendet wird oder nicht;
- 30 • Eine Unabhängigkeit von der Laserwellenlänge erreicht wird,
dadurch, das die automatische Klassifikation und die
Berechnung der Laserschnittlinie durch den Einsatz von
laserwellenunabhängige, bildgebende Verfahren erreicht wird;
- Durch geeignete Skalierung der Laserschnittlinie erreicht wird,

- 5 dass die Objekt Klassifikation und die Laserschnittlinienbestimmung bei niedriger Vergrößerung vorgenommen werden kann und dadurch ein größeres Sehfeld mehr Objekte zu detektieren gestattet, und das dann der eigentliche Ausschneideprozess bei einer höheren Vergrößerung vorgenommen wird;
- 10 • Dass durch den Einsatz von Piezoaktoren für die x, y Verschiebung die Genauigkeit des Laserschnittes erhöht werden kann;
- 15 • Dass durch die Verwendung von x, y Verstelleinrichtungen die Objekt und dessen Laserschnittlinie in der Nähe der optischen Achse positioniert werden kann um so optimale Schneidbedingungen zu bekommen. Dabei wird der Ausschneideprozess von der Ablenkeinheit in der Auflichtachse des Mikroskops vorgenommen während der Tisch die auszuschneidenden Objekte automatisch nahe der optischen Achse positioniert;
- 20 • Dass durch den Einsatz einer geeigneten Linearkombination von Bewegungen durch Mikroskoptisch, x, y Piezo und Ablenkeinheit für den Laserschnitt eine Vergrößerung der Schnittgeschwindigkeit bei gleichzeitiger Erhöhung der Schnittpräzision erfolgt;
- 25 • Dass durch den Einsatz eines Autofokus der schneidende Laserstrahl immer in die optimale Schnittposition gebracht werden kann und daher ein automatisierter Ausschneideprozess von tausenden von Objekten ohne Überwachung durch einen Benutzer erfolgen kann;
- 30 • Dass die Geschwindigkeit des Systems durch den Einsatz eines Autofokus in Verbindung mit einem z- Piezo, derart, dass der z- Piezo direkt das Objektiv in z – Richtung verstellt, wesentlich erhöht wird und daher ein automatisierter Ausschneideprozess von tausenden von Objekten ohne Überwachung durch einen Benutzer erfolgen kann;

20. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**,
dass zusätzlich eine automatische Abstandsveränderung der
Laserschnittlinie vom Objekt zum Zwecke des artefaktfreien
Ausschneidens vorgesehen ist mit folgenden Schritten:

- 5 • Die Koordinaten der einzelnen Punkte der Laserschnittlinie
 durch eine geeignete bildanalytische Bearbeitung der
 Bildobjekte vor der eigentlichen Schnittlinienbestimmung in
 größerem Abstand vom Objekt verlaufen. Insbesondere
 Dilatation des Binärbildes vor der Schnittlinienberechnung
10 ermöglicht ein determiniertes Vergrößern des Objektes um die
 gewünschte Anzahl von Pixeln. Die Vergrößerten Objekte
 dienen sodann als Grundlage der Laserschnittlinienberechnung
 wie oben beschrieben;
- 15 • Die Koordinaten der einzelnen Punkte der Laserschnittlinie
 durch eine geeignete Skalierungstransformation vergrößert
 werden und so den Laserstrahl in gesicherter Entfernung um
 das Objekt herumführen;
- 20 • Dass der Laserabstand durch ein Softwareinterface für den
 Benutzer bequem einstellbar ist um z.B. dem Benutzer das
 Testen von Systemeinstellungen zu erlauben insbesondere in
 Hinblick auf die Prozessautomatisierung
- Dass der Laserabstand automatisch berechnet wird und zur
 Anwendung kommt um so vollautomatische Prozesse zu
 ermöglichen.

25 21. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**,
dass zusätzlich ein Ausgleich von Verzerrungen bei der Abbildung
vorgesehen ist mit folgenden Schritten:

- Der Skalierungsfaktor wird ortsabhängig formuliert und
- somit wird jeder Laserschnittlinien-Konturpunkt individuell so
30 verzerrt, dass eine Kompensation von Abbildungsfehlern
 erfolgt.

22. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**,

dass zusätzlich eine Manipulation, Linearkombination und

5 Fehlerkompensation der Laserschnittlinien, die zuvor automatisch oder manuell oder von einem Datenträger eingelesen wurden, vorgesehen ist mit folgenden Schritten:

- 10 • Auf die nach obigem Verfahren errechneten Laserschnittlinien eine Matrixtransformation zum Zwecke der Translation aller Laserschnittlinienpunkte um einen bestimmten Betrag in x und y Richtung angewendet wird;
- 15 • Auf die nach obigem Verfahren errechneten Laserschnittlinien eine Matrixtransformation zum Zwecke der Skalierung aller Laserschnittlinienpunkte um einen bestimmten Betrag in x und y Richtung angewendet wird;
- 20 • Auf die nach obigem Verfahren errechneten Laserschnittlinien eine Matrixtransformation zum Zwecke der Rotation aller Laserschnittlinienpunkte um einen bestimmten Betrag in x und y Richtung angewendet wird;
- 25 • Auf die nach obigem Verfahren errechneten Laserschnittlinien eine beliebige Komposition von Matrixtransformationen zum Zwecke der Schrittweisen Translation, Skalierung und Rotation aller Laserschnittlinienpunkte um einen bestimmten Betrag in x und y Richtung angewendet wird;
- 30 • Durch Einsatz von Matrixtransformationen, speziell der Translationsmatrix, ungenaue Mikroskopisch Repositionierungen kompensiert werden können indem as Laserschnittmuster um einem bestimmten Betrag dy , dy , welcher dem Ungenauigkeitsbetrag der Tischrepositionierung entspricht;
- Die Kompensationen durch direkte Manipulation der Koordinatenmatrix eines Laserschnittmusters geschieht, also ohne aktive Tischbewegung auskommt sondern allein durch die

Ablenkeinheit des Lasers in der Auflichtachse des Mikroskops
bewerkstelligt werden kann;

- Sich Laserschnittmuster beliebig wiederholen lassen indem
man ein Array von Laserschnittmustern per zyklisch
wiederholter Matrixtransformation in beliebigen Mustern
erzeugen kann. Dies ermöglicht eine statistische Entnahme
großer, gleichartig geformter Proben aus einer Probe;
- Dass die Manipulationsfaktoren, Linearkombinationen, und
Fehlerkompensationsfaktoren in einer geeigneten Weise auf
elektronischen Datenträgern oder in Datenbanken etc.
abgespeichert und wieder aufgerufen werden können.

5

10

Zusammenfassung

In einem Verfahren zur Laser-Mikrodissektion wird zu einem
5 auszuschneidenden Objekt in einem mikroskopischen Präparat eine Soll-
Schnittlinie markiert und anschließend das Objekt mittels einer
Relativbewegung zwischen Laserstrahl und Präparat ausgeschnitten. Das
Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass ein elektronisches Bild zumindest
eines Bildausschnittes des Präparats aufgenommen wird, dass der
10 Bildausschnitt bildanalytisch bearbeitet wird, wobei mindestens ein
auszuschneidende Objekt automatisch ermittelt wird, und dass anschließend
die Soll-Schnittlinie um das mindestens ein auszuschneidende Objekt
automatisch bestimmt wird. In einer vorteilhaften Ausgestaltung wird
zusätzlich die zugehörige Laserschnittlinie automatisch erzeugt.

15

(Fig. 1.2)

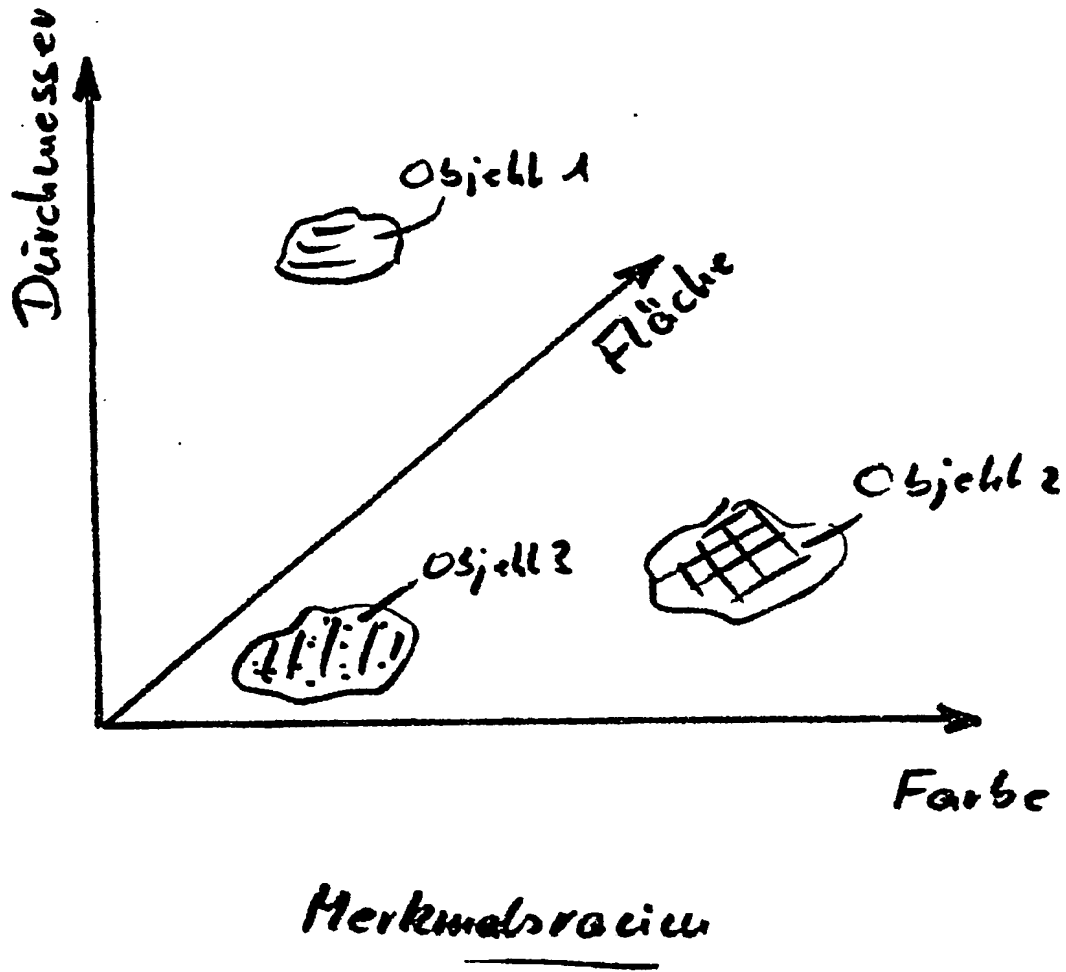


Fig. 1.1

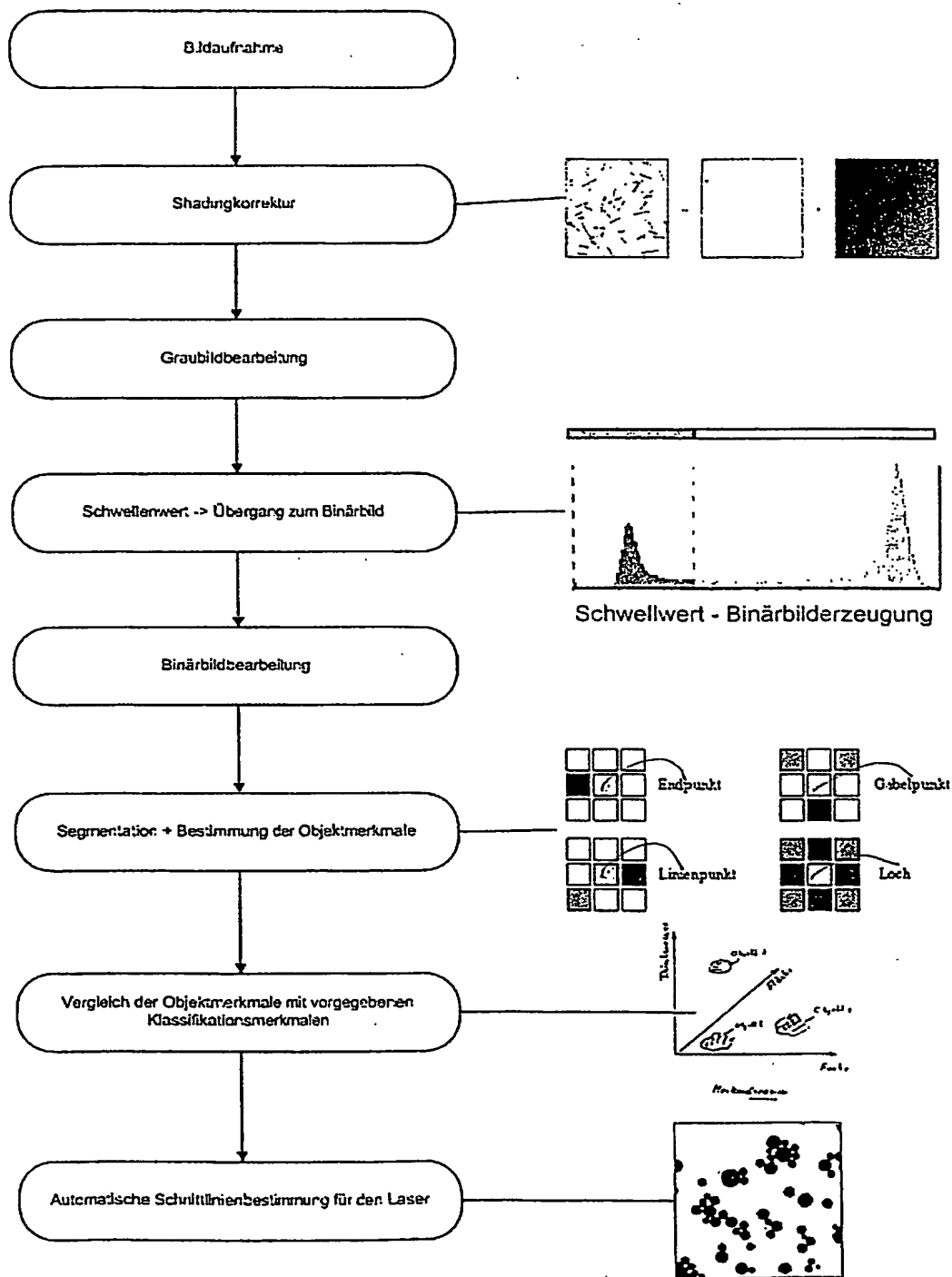


Fig 1.2

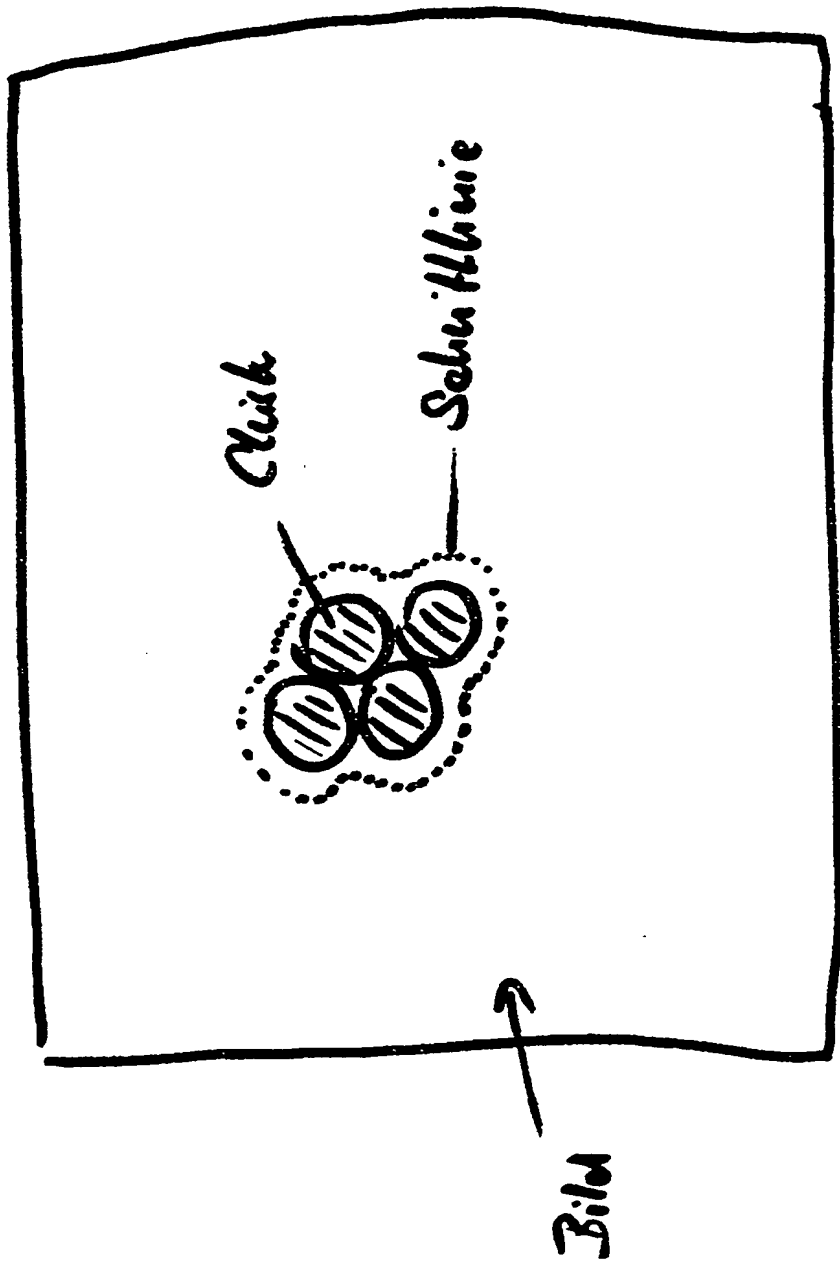


Fig. 13

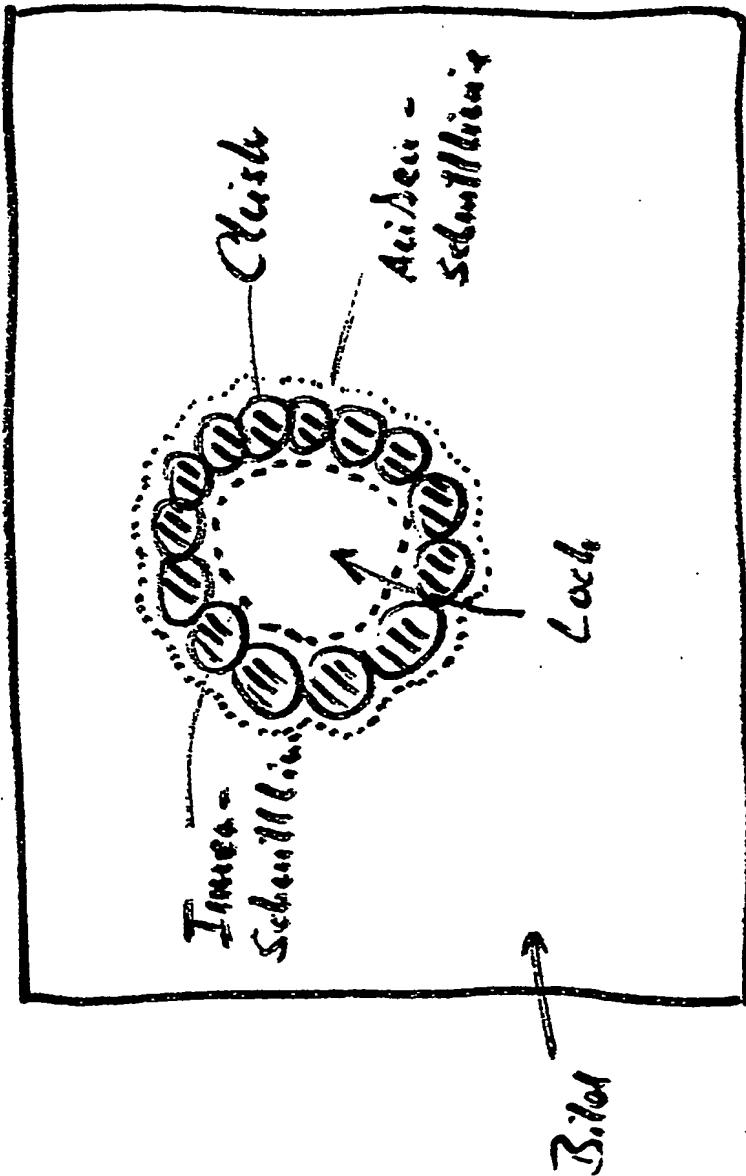


Fig. 1.4

(x, y)

$\begin{matrix} \xrightarrow{x} \\ \uparrow y \end{matrix}$

0,0	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0
0,1	1,1	2,1	3,1	4,1	5,1	6,1	7,1	8,1	9,1	10,1
0,2	1,2	2,2	3,2	4,2	5,2	6,2	7,2	8,2	9,2	10,2
0,3	1,3	2,3	3,3	4,3	5,3	6,3	7,3	8,3	9,3	10,3
0,4	1,4	2,4	3,4	4,4	5,4	6,4	7,4	8,4	9,4	10,4
0,5	1,5	2,5	3,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	10,5
0,6	1,6	2,6	3,6	4,6	5,6	6,6	7,6	8,6	9,6	10,6
0,7	1,7	2,7	3,7	4,7	5,7	6,7	7,7	8,7	9,7	10,7

Fig. 1.5

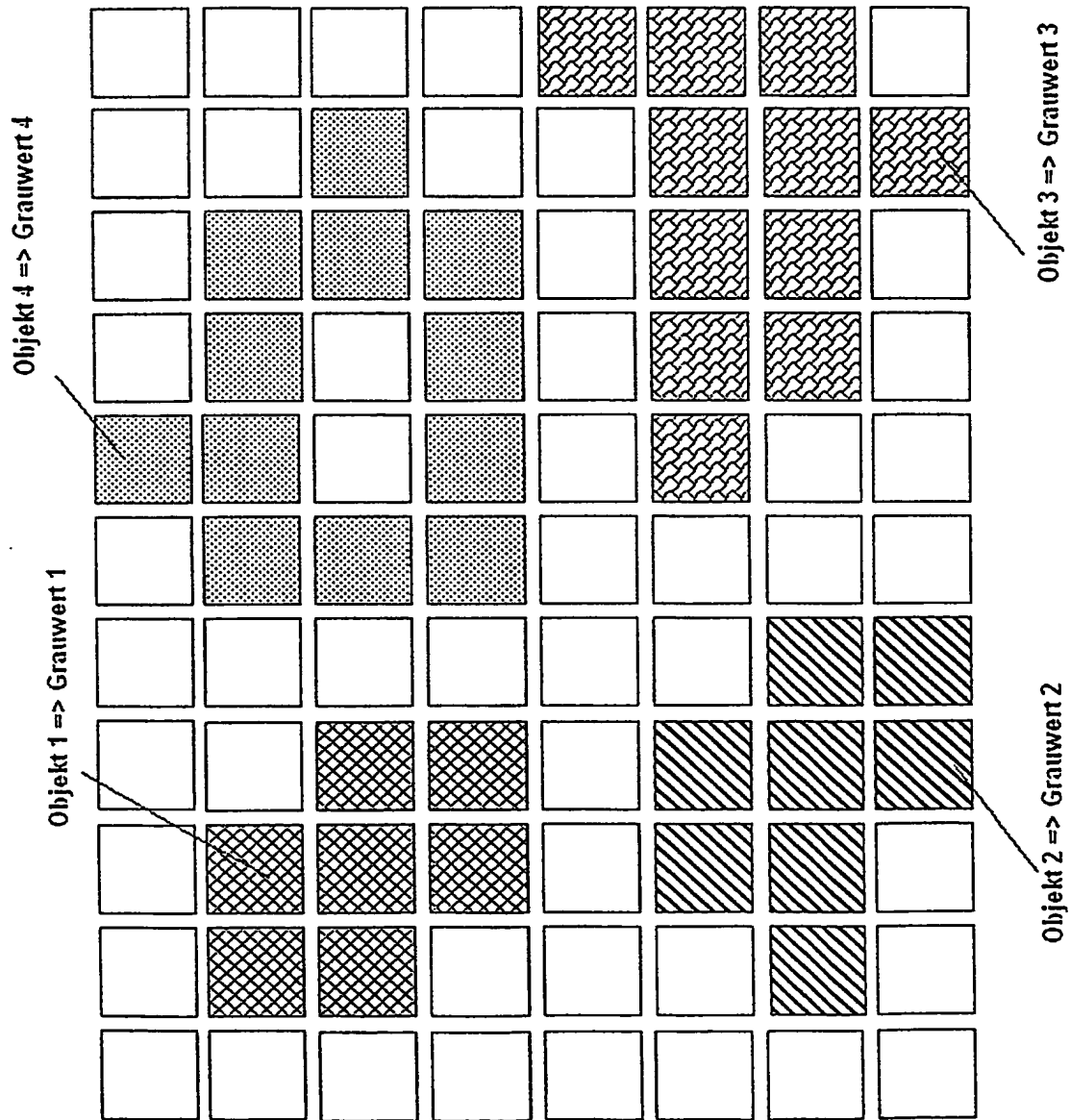
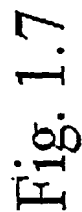
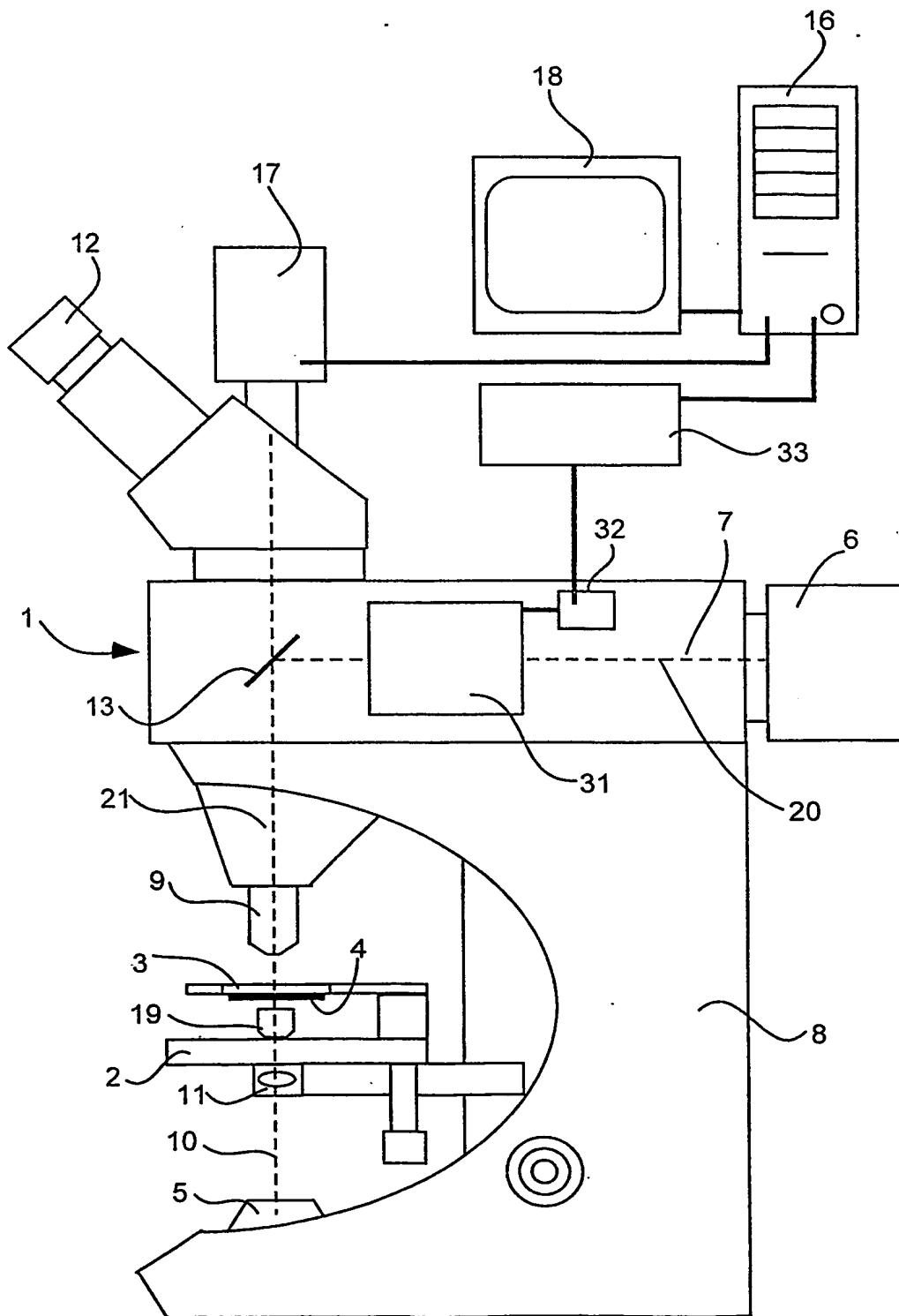


Fig. 1.6



**Fig. 2**